



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**S-ADENOZİL-L-METİYONİN'İN ORAL YOLLA VERİLİŞTE
BİYOYARARLANIMINI ARTIRMAK
İÇİN FORMÜLASYON YAKLAŞIMLARI:
İN VİTRO VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMELERİ**

Ahmet Doğan ERGİN

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Nilüfer YÜKSEL**

ANKARA

2019

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**S-ADENOSİL-L-METİYONİN'İN ORAL YOLLA VERİLİŞTE
BİYOYARARLANIMINI ARTIRMAK
İÇİN FORMÜLASYON YAKLAŞIMLARI:
İN VİTRO VE İN VİVO DEĞERLENDİRİLMELERİ**

Ahmet Doğan ERGİN

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Nilüfer YÜKSEL**

Bu Araştırma TÜBİTAK 1001 projeleri kapsamında 115S339 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2019

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “S-Adenozil-L-Metiyonin’in Oral Yolla Verilişte Biyoyararlanımını Artırmak İçin Formülasyon Yaklaşımları: İn Vitro Ve İn Vivo Değerlendirilmeleri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan hazırlanmıştır. Tezimin 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.

Ahmet Doğan ERGİN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında

Ahmet Doğan ERGİN tarafından hazırlanan “S-Adenozil-L-Metiyonin’in Oral Yolla Verilişte Biyoyararlanımını Artırmak İçin Formülasyon Yaklaşımları: İn Vitro Ve İn Vivo Değerlendirilmeleri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/ OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Prof.Dr.Nurten ÖZDEMİR

Ankara Üniversitesi

Prof.Dr. Nilüfer YÜKSEL

Ankara Üniversitesi

Prof.Dr. İsmail Tuncer DEĞİM

Biruni Üniversitesi

Prof.Dr.Erem BİLENSOY

Hacettepe Üniversitesi

Doç.Dr. Müge KILIÇARSLAN

Ankara Üniversitesi

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

İmza

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xv
Çizelgeler	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1.Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	1
1.1.1.Polimerik Nanopartiküller	2
1.1.2.Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu	5
1.2.Kolona Hedeflendirilmiş İlaç Taşıyıcı Sistemler	14
1.2.1.Kolon Yapısı ve Fizyolojisi	15
1.2.2.Mikrobiyota	17
1.2.3.Kolonik İlaç salım Stratejileri	20
1.3.Kaplama Teknolojisi	27
1.3.1.Film kaplama	28
1.3.2.Kaplamada Kullanılan Cihazlar	30
1.3.3.Akışkan Yatak Sisteminde Kaplama İşlemi	30
1.4.Çalışmada Kullanılan Polimerler	37
1.4.1.Kitozan	37
1.4.2.Pektin	41
1.4.3.İnülin	45
1.5. S-Adenozil-L-Metiyonin	47
1.5.1.SAMe'nin Moleküler Düzeyde Fonksiyonları	48
1.5.2.SAMe'nin Farmakokinetik Özellikleri	52
1.5.3. SAMe'nin Stabilitesi	54
2.GEREÇ VE YÖNTEM	56
2.1. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	56
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	57

2.3. Çalışmalarda Kullanılan Ortamların Bileşimi ve Hazırlanması	58
2.4. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi	60
2.4.1. SAME'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi	60
2.4.2. SAME'nin HPLC ile Su Ortamındaki Standart Doğrularının Hazırlanması	61
2.4.3. SAME'nin Su, SGF ve SCoF2 Ortamlarında UV Spektrofotometrisi Analizi	61
2.4.4. SAME'nin Su, SGF ve SCoF2 Ortamındaki Standart Doğrularının Hazırlanması	62
2.4.5. SAME'nin Plazma Ortamındaki HPLC Analizi	62
2.4.6. SAME'nin HPLC ile Plazmadaki Standart Doğrularının Hazırlanması	63
2.5. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonları	63
2.6. Etkin Maddenin Piyasa Preparatı Üzerine İncelemeler	69
2.7. Formülasyon Çalışmaları	70
2.7.1. Kitozan Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu	70
2.7.2. Pektin Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu	71
2.7.3. İnülin Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu	72
2.8. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu	74
2.9. Optimum Formülün Seçilmesi	78
2.10. Etkin Madde Salımının Modifiye Edilmesi için Çalışmalar	81
2.11. SAME Yüklü Formülasyonların İn Vivo Etkinliğinin İncelenmesi	89
3. BULGULAR	91
3.1. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi	91
3.1.1. SAME'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi	91
3.1.2. SAME'nin HPLC ile Su Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular	92
3.1.3. SAME'nin Su, SGF ve SCoF2 Ortamlarında UV Spektrofotometrisi Analizi	93
3.1.4. SAME'nin UV Spektrofotometrisi ile Su, SGF ve SCoF Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular	94
3.1.5. SAME'nin Plazma Ortamındaki HPLC Analizi	95
3.1.6. SAME'nin HPLC ile Plazma Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular	96
3.2. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonları	98
3.3. Etkin Maddenin Piyasa Preparatının Analizine Ait Bulgular	106
3.4. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	106
3.4.1. Kitozan Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonuna Ait Bulgular	106

3.4.2.Pektin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Optimizasyonuna Ait Bulgular	110
3.4.3.İnülin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Optimizasyonuna Ait Bulgular	117
3.5.Optimum Formülün Seçilmesi	125
3.5.1.Seçilen Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesine Ait Bulgular	126
3.5.2.Nanopartiküllerin Görüntülenmesine Ait Bulgular	129
3.6.Etkin Madde Salımının Modifiye Edilmesi için Çalışmalara Ait Bulgular	131
3.6.1. Akışkan Yatak Cihazında Kaplama Prosesinin Ön Denemelerine İlişkin Bulgular	131
3.6.2 Pelletlerin Görüntülenmesi	136
3.6.3.Pelletlerde Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesine Ait Bulgular	137
3.6.4.Nanopartiküller, Kaplanmış Pelletlerde Stabilitate Çalışmalarının Bulguları	139
3.7.SAMe Yüklü Formülasyonların İn Vivo Etkinliğine Ait Bulgular	143
4.TARTIŞMA	146
4.1.SAMe'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	146
4.1.1.SAMe'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi	146
4.1.2. SAMe'nin Su, SGF ve ScoF2 Ortamlarında UV Spektrofotometrisi Analizi	147
4.1.3.SAMe'nin Plazma Ortamındaki HPLC Analizi	148
4.2.SAMe'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonlarına İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	148
4.3.Etkin Maddenin Piyasa Preparatının Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	152
4.4.Formülasyon Çalışmalarına İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	153
4.4.1.Kitozan Nanopartikül Formülasyonları	153
4.4.2.Pektin Nanopartikül Formülasyonları	155
4.4.3.İnülin Nanopartikül Formülasyonları	158
4.5.Optimum Formülasyonların Seçilmesi	164
4.5.1.Seçilen Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	164
4.5.2.Nanopartiküllerin Görüntülenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	166
4.6.Etkin Madde Salımının Modifiye Edilmesi için Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	167

4.6.1.Akışkan Yatak Cihazında Kaplama Çalışmalarının Ön Denemelerine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	167
4.6.2.Kaplanmış Pelletlerde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	170
4.6.3.Pelletlerin Görüntülenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	172
4.6.4.Kaplanmış Pelletlerde Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	172
4.6.5.Nanopartiküller, Kaplanmış Pelletlerde Stabilite Çalışmalarının Bulgularının Değerlendirilmesi	173
4.7.SAMe Yüklü Formülasyonların İn Vivo Etkinliğine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	175
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	177
ÖZET	179
SUMMARY	180
KAYNAKLAR	181
EKLER	200
Ek-1. Etik Raporu	200
ÖZGEÇMİŞ	2011

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında düşük biyoyararlanım ve stabilite problemlerinden dolayı kullanımı kısıtlı S-Adenozil-L-metiyonin molekülünün oral biyoyararlanımının arttırılması amacıyla kolona hedeflendirme çalışmaları yürütülmüştür. Kolona hedefleme amacıyla prebiyotik etkili ve kolon-spesifik degrade olan inülin ve pektin ile biyoadeziv etkili ve kolonda sıkı birleşim yerlerini (tight junction) açarak permeabiliteyi artıran kitozan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Prebiyotik özellikte oligo- ve polisakkaritlerin kullanılması ile mikrobiyota üzerine yararlı etki sağlanarak SAME'nin depresyon tedavisindeki etkinliğine katkıda bulunması hedeflenmiştir (enterik sinir sistemi-beyin ilişkisi). Bu çalışmalar sonucunda stabil ve biyoyararlanımı arttırılmış formülasyonlar elde edilmiştir. Bu formülasyonlar yeni üretilcek formülasyonlar için örnek teşkil edecektir.

Doktora eğitimim boyunca ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen, bana her aşamada birşeyler öğretmeye çalışan, çalışkanlığı, üretkenliği ve yüksek iş ahlakı gibi önemli meziyetler açısından her zaman örnek aldığım ve alacağım Sayın Hocam Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL'e tez çalışmamda gösterdiği bilimsel katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca bilimsel deneyimlerinden sıkça yararlandığım, ilgisini, bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen çok sevgili hocam Doç.Dr. Zerrin SEZGİN-BAYINDIR'a çok teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamı 115S339 no'lu araştırma projesi kapsamında destekleyen TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı'na çok teşekkür ederim.

Çalışma süreci boyunca sağladıkları imkan ve ilgilerinden dolayı Farmasötik Teknoloji Bölüm Başkanımız Prof.Dr. Nurten ÖZDEMİR'e ve eğitimim boyunca sevgilerini ve bilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Nilüfer TARIMCI'ya,

Prof.Dr. Asuman BOZKIR'a, Prof.Dr. Ayşegül KARATAŞ'a, Prof.Dr. Tansel ÇOMOĞLU'na, Prof.Dr. Canan HASÇİÇEK'e, Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN'a, Doç.Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK'e, Doç.Dr. Ulya BADILLI'ya, Doç.Dr. Burcu DEVRİM'e, Dr.Öğr.Üyesi Özge İNAL'a, Dr.Öğr. Üyesi Ongun Mehmet SAKA'ya teşekkür ederim. Doktora tez izleme komitemde yer alan değerli öğretim üyeleri Sayın Prof.Dr.İsmail Tuncer DEĞİM ve Prof.Dr.Erem BİLENSOY'a çalışmalarım boyunca verdikleri destekler ve öneriler için çok teşekkür ederim.

İn vivo deneylerin yapılmasında laboratuvarlar imkanlarını sunan Farmakoloji Anabilim Dalı'na, deney aşamasında bizzat bulunarak bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım çok değerli hocam Prof. Dr. Arif Tanju ÖZÇELİKAY ve teknisyen İsmail BAŞER'e ve desteklerini esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı'dan Dr.Öğr.Üyesi Işıl ÖZAKÇAY'a, Araştırma görevlisi Ecz. Betül ERDOĞAN'a, Araştırma görevlisi Ecz. İrem KARAÖMERLİOĞLU'na teşekkür ederim. İn vivo HPLC çalışmalarım boyunca bilimsel deneyimlerinden ve bilgilerinden faydalandığım Prof. Dr. Sibel ÖZKAN, Dr.Öğr.Üyesi Mehmet GÜMÜŞTAŞ, Doç.Dr. Gökhan Mehmet ÇAĞLAYAN ve Doç.Dr. İsmail Murat PALABIYIK'a ve Ecz. Ayşenur OKTAY'a çok teşekkür ederim.

XPRD analizlerinin yapılmasında sağlamış oldukları destek için Nobel İlaç ve Sanayii'ne ve Ar-Ge sorumlusu Dr.Ecz. Abdullah USLU'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve en büyük destekçimlerimden olan değerli arkadaşlarım Dr.Ecz.Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN'e, Dr.Ecz Gülin AMASYA'ya, Dr.Ecz. Aslıhan Hilal ALGAN'a, Dr. Ecz. Umut Can ÖZ'e, Dr. Ecz.Tugba EREN BÖNCÜ'ye, Uzm.Ecz.Rüya TOPAL'a, Ecz. Miray İLHAN'a, Ecz. Özge GÜN'e çok teşekkür ederim.

Evlatları olmaktan her zaman gurur duyduğum sevgili babam Zeki ERGİN'e ve annem Türkan ERGİN'e, her zaman ve her koşulda yanımda olan canım kardeşim Sabır Batuhan ERGİN'e çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%BSS	%Bağıl standart sapma
%YE	% Yükleme Etkinliği
AUC _{0→24}	Plazma konsantrasyonu-zaman eğrisinin altında kalan alan (µg/mL.saatt)
C _{MAX}	Maksimum plazma konsantrasyonu (µg/mL)
DLS	Dinamik ışık saçılımı (Dynamic light scattering)
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential Scanning Calorimetry)
EMA	Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency)
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography)
HPMC	Hidroksipropil metil selüloz
LOD	Teşhis sınırları (Limit of Detection)
LOQ	Tayin sınırları (Limit of Quantification)
MA	Molekül ağırlığı
PDI	Polidispersite indeksi
r ²	Determinasyon katsayısı
SAMe	S- adenosil-L-metiyonin 1,4 butanedisülfonat tuzu
SGF	Simüle mide ortamı
SCOF	Simüle kolon ortamı
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
T _{MAX}	Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmak için geçen süre (saat)
XRPD	X ışını Toz Difraktometrisi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1	Boyutsal ölçeklendirilmiş sistemde genel olarak kullanılan nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemler	2
Şekil 1.2	Membranlardan geçiş mekanizmaları	11
Şekil 1.3	BCS Sınıflandırma sistemi	11
Şekil 1.4	Ussing chamber ve ters çevrilmiş bağırsak kesesi	12
Şekil 1.5	Paralel Yapay Membranlar	13
Şekil 1.6	Kolonun yapısı	15
Şekil 1.7	Farklı gastrointestinal segmentlerdeki pH değişimi	16
Şekil 1.8	Yapılan çalışmada farklı formülasyonların dokulardaki konsantrasyonu	22
Şekil 1.9	Film kaplama aşamaları	28
Şekil 1.10	Sulu dispersiyonun film oluşturma mekanizması (T:sıcaklık, T _g :Camsı geçiş sıcaklığı, MFFT: minimum film oluşum sıcaklığı)	29
Şekil 1.11	Kaplama kullanılan klasik kaplama kazanları	30
Şekil 1.12	Tozların akışkanlaştırılması	31
Şekil 1.13	Akışkan Yatak Tipleri	32
Şekil 1.14	Kitin deasetilasyonu	38
Şekil 1.15	Pektinin kimyasal yapısı	41
Şekil 1.16	İnülin kimyasal formülü	46
Şekil 1.17	SAME'nin ve diastereoizomerlerinin kimyasal formülü	47
Şekil 1.18	SAME'nin metabolizması	50
Şekil 2.1	Ekstraksiyon yöntemi akış şeması	64
Şekil 2.2	Teorik plaka sayısının hesaplanması ve şematik gösterimi	68
Şekil 2.3	Akışkan yatakta kaplama işlemi	84
Şekil 3.1	SAME'nin farklı ortamlardaki spektrumları	91
Şekil 3.2	Su ortamındaki SAME S,S ve R,S pikini gösteren kromatogram	92
Şekil 3.3	SAME'nin HPLC cihazında su ortamındaki standart doğrusu	93
Şekil 3.4	SAME'nin su, SGF, ve SCoF2 ortamındaki spektrumları	93
Şekil 3.5	SAME'nin su ortamındaki UV spektrofotometrisi ile standart doğrusu	94
Şekil 3.6	SAME'nin SGF'de UV Spektrofotometre ile elde edilen standart doğrusu	94
Şekil 3.7	SAME'nin SCoF2'de UV spektrofotometrisi ile elde edilen standart doğrusu	95
Şekil 3.8	SAME'nin plazma ortamındaki spektrumu	95
Şekil 3.9	SAME'nin 1 µg/ml konsantrasyonda su ortamında ve plazma ortamındaki kromatogramları	96
Şekil 3.10	SAME 'nin plazma ortamındaki standart doğrularının kromatogramları (a: genel görünüm, b: büyütülmüş görünüm)	97

Şekil 3.11	SAMe'nin plazma ortamında HPLC ile elde edilen standart doğrusu	97
Şekil 3.12	Farklı ortam, sıcaklık ve sürelerde SAMe'nin S,S diastereoizomerinin % değişimi	103
Şekil 3.13	UV spektrofotometrisi ile farklı ortam, sıcaklık ve sürelerde SAMe'nin % konsantrasyon değişim grafiği	105
Şekil 3.14	FK1 - FK8 formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı	107
Şekil 3.15	Kitozan nanopartiküllerinin (FK5) ışık mikroskopundaki görüntüleri (Büyütme: x40, x100)	108
Şekil 3.16	FK5 ve FK6 formüllerinin partikül büyüklük ve dağılımı	109
Şekil 3.17	BaCl ₂ ve CaCl ₂ çapraz bağlayıcılı pektin nanopartiküllerinden etkin maddenin salım profilleri	111
Şekil 3.18	FP5-FP12 formülasyonları ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımı	112
Şekil 3.19	Optimizasyon için hazırlanan pektin nanopartiküllerinden etkin maddenin salım profilleri	113
Şekil 3.20	Pektin (X ₁) - BaCl ₂ (X ₂) miktarları (soldaki grafik) ve pektin (X ₁) - SAMe (X ₃) miktarları ile (sağdaki grafik) nanopartiküllerin etkin madde yükleme etkinliğinin değişimini gösteren yüzey grafiği	114
Şekil 3.21	BaCl ₂ (X ₂) ve SAMe (X ₃) miktarları ile nanopartiküllerin etkin madde içeriğinin değişimini gösteren yüzey grafiği	115
Şekil 3.22	BaCl ₂ (X ₂) - pektin (X ₁) miktarları (soldaki grafik) ve BaCl ₂ (X ₂) - SAMe (X ₃) miktarları ile (sağdaki grafik) nanopartiküllerin τ_d zamanının değişimini gösteren yüzey grafiği	115
Şekil 3.23	Enzimli ve enzim içermeyen ortamlarda, FP9 formülasyonu ile hazırlanan pektin nanopartiküllerinden etkin maddenin salım profilleri (üst profiller 24 saatlik salımı, alt profiller ilk 8 saatlik salımı göstermektedir) ve f ₂ benzerlik faktörü ile profil	116
Şekil 3.24	SAMe'nin yapay membranlardan permeasyonu üzerinde pektin nanopartikül formülasyonunun etkisi	117
Şekil 3.25	SAMe miktarı ve SAMe ile SLS arasında iyon çifti oluşturarak yükleme etkinliğini artırmak için hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımı	119
Şekil 3.26	Optimizasyon için hazırlanan inülin nanopartiküllerinden etkin maddenin salım profilleri (üst profil 24 saatlik profili, alt profil ilk 8 saatlik profili göstermektedir)	120
Şekil 3.27	SAMe miktarı ve SAMe:SLS oranının nanopartiküllerin karakteristikleri üzerine etkisini gösteren cevap - yüzey grafiği	122
Şekil 3.28	Üretilen 3 paralel formülün ve birleştirilmiş kütlenin partikül boyut dağılımı	123
Şekil 3.29	Enzimli ve enzim içermeyen ortamlarda, FI18 formülasyonu ile hazırlanan inülin nanopartiküllerinden etkin maddenin çözünme profilleri (üst profil 24 saatlik SAMe salımını, alt	124

	profil ilk 8 saatlik salımı göstermektedir) ve f_2 benzerlik faktörü	
Şekil 3.30	SAMe'nin yapay membranlardan permeasyonu üzerinde inülin nanopartikül formülasyonunun etkisi	125
Şekil 3.31	Optimum formülasyonlardan hazırlanan nanopartiküllerden etkin madde salım profilleri	126
Şekil 3.32	FP9 formülasyonuna ait DSC termogramları (a:SAMe, b:Pektin, c:BaCl ₂ , d: NaHCO ₃ , e:FP9, f:FP9 fiziksel karışım)	127
Şekil 3.33	FI18 formülasyonuna ait DSC termogramları (a:SAMe, b:İnülin, c:SLS, d:EDC, e:FI18, f:FI18 fiziksel karışım)	127
Şekil 3.34	FP9 formülasyonuna ait X ışını difraktogramları (a: SAMe, b: Pektin, c: BaCl ₂ , d:NaHCO ₃ , e: FP9 nanopartikülleri, f: FP9 fiziksel karışım)	128
Şekil 3.35	FI18 formülasyonuna ait X ışını difraktogramları (a:SAMe, b:inülin, c:Sodyum lauril sülfat, e:FI18 nanopartikülleri, f:FI18 fiziksel karışım)	129
Şekil 3.36	FP9 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerin SEM görüntüleri	129
Şekil 3.37	FP9 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerin TEM görüntüleri	130
Şekil 3.38	FI18 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerin SEM görüntüleri	130
Şekil 3.39	Kaplamadan elde edilen ürünlerin fotoğrafları ve mikroskop görüntüleri	132
Şekil 3.40	Farklı kaplama oranlarına sahip pelletlerle yapılan çözünme hızı grafiği	132
Şekil 3.41	Pektin nanopartiküllerinin kaplandığı pelletlerin partikül büyüklük dağılımları (Kırmızı: K ₀ , Yeşil: K ₁ FP9, Kırmızı: K ₂ FP9)	133
Şekil 3.42	İnülin nanopartiküllerinin kaplandığı pelletlerin partikül büyüklük dağılımları (Mavi: K ₀ , Kırmızı: K ₁ FI18, Yeşil: K ₂ FI18)	133
Şekil 3.43	FI18 formülü ile hazırlanan nanopartiküllerin kaplama öncesi ve sonrası partikül büyüklük dağılım grafiği	134
Şekil 3.44	FP9 formülü ile hazırlanan nanopartiküllerin kaplama öncesi ve sonrası partikül büyüklük dağılım grafiği	135
Şekil 3.45	Nanopartiküller ve kaplanmış formüllere ait çözünme hızı çalışmaları	136
Şekil 3.46	Pektin nanopartikülleri ile hazırlanan K ₂ FP9 pellet formülüne ait SEM görüntüleri	136
Şekil 3.47	İnülin nanopartikülleri ile hazırlanan K ₂ FI18 pellet formülüne ait SEM görüntüleri	137
Şekil 3.48	K ₂ FP9 formülüne ait DSC termogramı(a:SAMe, b:FP9, c:K ₂ FP9, d:Pharmacoat 606, e: PEG6000, f:Fonk.kaplama dispersiyonu , g:K ₂ FP9 fiziksel karışımı h:İnert pellet).	137
Şekil 3.49	K ₂ FI18 formülüne ait DSC termogramı(a:SAMe, b:FI18, c:K ₂ FI18, d:Pharmacoat 606, e: PEG6000, f:Fonk.kaplama dispersiyonu , g:K ₂ 18 fiziksel karışımı h:İnert pellet)	138

Şekil 3.50	K ₂ FP9 formülü bileşenlerine ait X ışını difraktogramları (a:SAMe, b:FP9 nanopartikülü, c: K ₂ FP9 pelletleri, d: Alt kaplama fiziksel karışım, e:Fonksiyonel kaplama formülü, f: K ₂ FP9 fiziksel karışımı, g: inert pellet)	138
Şekil 3.51	K ₂ FI18 formülü bileşenlerine ait X ışını difraktogramları (a: SAMe, b: FI18 nanopartikül, c: K ₂ FI18 pellet, d: Alt kaplama fiziksel karışım, e: Fonksiyonel kaplama formülü, f: K ₂ FI18 fiziksel karışımı, g: inert pellet)	139
Şekil 3.52	SAMe çözeltisi ve formülasyonlarının plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri	143



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1	Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında genel olarak kullanılan polimerler	3
Çizelge 1.2	Polidispersite indeksileri ve ifade ettiği dispersite düzeyleri	7
Çizelge 1.3	Farklı gastrointestinal segmentlerdeki pH değerleri	16
Çizelge 1.4	Farklı gastrointestinal segmentlerden geçiş süreleri	17
Çizelge 1.5	Çeşitli hastalıklarda mikrobiyotanın rolü	21
Çizelge 1.6	Kolona hedeflendirilmiş bazı ön ilaç çalışmaları	23
Çizelge 1.7	Film kaplamada en çok kullanılan bazı polimerler	29
Çizelge 1.8	Akışkan yatak sistemlerinde işlem parametreleri	34
Çizelge 1.9	SAMe'ye ait fizikokimyasal özellikler	48
Çizelge 1.10	SAMe'nin depresyon etkisi üzerine yapılan klinik çalışmalar	53
Çizelge 2.1	Farklı yöntemler ve farklı ortamlarda yapılan etkin madde miktar tayinlerinin analitik validasyonları için uygulama koşulları	64
Çizelge 2.2	BIOSAME® etkin madde içeriği	69
Çizelge 2.3	Kitozan formülasyonlarının bileşimleri	71
Çizelge 2.4	Pektin nanopartikül formülasyonlarının bileşimleri	72
Çizelge 2.5	İnulin nanopartikül formülasyonlarının bileşimleri	73
Çizelge 2.6	Faktöriyel tasarım bağımsız değişkenleri ve düzeyleri	73
Çizelge 2.7	İnulin nanopartikülleri tasarım formülleri	74
Çizelge 2.8	Nanopartikül formülasyonlarında etkin madde ve yardımcı madde etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla DSC ve XRPD analizi için hazırlanan numuneler.	79
Çizelge 2.9	İnert pelletler üzerine kaplama prosesi parametreleri ön denemeleri	83
Çizelge 2.10	İnert pelletler üzerine kaplama prosesi parametreleri	84
Çizelge 2.11	Nanopartiküller kullanılarak kaplanmış pellet formülasyonları	85
Çizelge 2.12	Pellet formülasyonlarında etkin madde ve yardımcı madde etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla yapılan DSC analizi için hazırlanan numuneler	88
Çizelge 2.13	Pellet formülasyonlarında etkin madde ve yardımcı madde etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla yapılan XRPD analizi için hazırlanan numuneler	89
Çizelge 3.1	SAMe'nin su ortamındaki HPLC ile miktar tayininde belirlenen koşullar	92
Çizelge 3.2	SAMe'nin plazma ortamındaki HPLC ile miktar tayininde belirlenen koşullar	96
Çizelge 3.3	SAMe'nin su ortamında HPLC ile miktar tayini yönteminin doğrusalılık ve aralığı ile standart doğruya ait istatistiksel veriler	98
Çizelge 3.4	SAMe'nin su, SGF ve SCoF2 ortamındaki UV spektrofotometrik miktar tayini için geliştirilen analitik	98

	yönteminin doğrusallık ve aralığı ile standart doğruya ait istatistiksel veriler	
Çizelge 3.5	SAMe'nin plazma ortamındaki miktar tayini için HPLC'de geliştirilen analitik yönteminin doğrusallık ve aralığı ile standart doğruya ait istatistiksel veriler	99
Çizelge 3.6	Geliştirilen analitik yöntemlerin doğruluğunun incelenmesine ait veriler	100
Çizelge 3.7	Geliştirilen analitik yöntemlerin kesinliğinin incelenmesine ait veriler	101
Çizelge 3.8	Geliştirilen analitik yöntemlerin SAMe teşhis ve tayin sınırları	101
Çizelge 3.9	HPLC 'de yapılan SAMe'nin S,S diastereoizomerinin su ortamındaki miktar tayininin uygunluk testleri sonuçları	102
Çizelge 3.10	Stabilite çalışmalarında belirlenen S,S ve R,S diastereoizomer konsantrasyonları	102
Çizelge 3.11	SAMe ve BIOSAME® karşılaştırması	106
Çizelge 3.12	Kitozan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonuna ait bulgular	107
Çizelge 3.13	Formülasyon parametrelerinin işlem sonuçlarına etkisinin istatistiksel verileri	108
Çizelge 3.14	FK5 ve FK6 formül serilerinin karakterizasyonuna ait bulgular	109
Çizelge 3.15	Farklı çapraz bağlayıcılarla üretilen pektin nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonuna ait bulgular	110
Çizelge 3.16	Çapraz bağlayıcı olarak BaCl ₂ ile hazırlanan formülasyonların karakterizasyonuna ait bulgular	112
Çizelge 3.17	MLR analizinin sonuçları ve varyans analizinden (ANOVA) elde edilen P değerleri	114
Çizelge 3.18	Pektin nanopartiküllerinden PAMPA ile elde edilen permeabilite bulguları	117
Çizelge 3.19	İnülin nanopartikül ön formülasyonlarının karakterizasyonuna ait bulgular	118
Çizelge 3.20	İnülin nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonuna ait bulgular	119
Çizelge 3.21	MLR analizinin sonuçları ve varyans analizinden (ANOVA) elde edilen P değerleri	121
Çizelge 3.22	FI18 formülünün tekrarlanabilirlik sonuçları	123
Çizelge 3.23	İnülin nanopartiküllerinden PAMPA ile elde edilen permeabilite bulguları	125
Çizelge 3.24	Optimum formülasyonlardan hazırlanan nanopartiküllerin özellikleri ($\pm$ SH)	126
Çizelge 3.25	Kaplama deneylerinin optimizasyonuna yönelik çalışmalara ilişkin gözlem ve yorumlar	131
Çizelge 3.26	İnülin ve pektin nanopartiküllerinin kaplanmış olduğu pelletlerin partikül büyüklük verileri ; Dv:Hacim çapı; Span=(Dv90 - Dv10)/ Dv50)	133
Çizelge 3.27	Nanopartiküller ile kaplanmış pelletlerin zeta potansiyelleri	134

Çizelge 3.28	FI18 formülasyonu ile hazırlanan nanopartiküllerin kaplama öncesi ve sonrası partikül boyutları	134
Çizelge 3.29	FP9 formülasyonu ile hazırlanan nanopartiküllerin kaplama öncesi ve sonrası partikül boyutları	135
Çizelge 3.30	Nanopartikül kaplı pelletlere ait miktar tayini sonuçları	135
Çizelge 3.31	FP9 formülüne ait stabilite bulguları(FP9*: Aynı formülün vakumlu ambalajda saklandığı ikinci stabilite çalışması)	140
Çizelge 3.32	FI18 formülü stabilite sonuçları	141
Çizelge 3.33	%14 oranında fonksiyonel kaplanmış saf SAME'nin stabilite sonuçları	141
Çizelge 3.34	Pektin nanopartikülleri ile hazırlanan K ₂ FP9 kodlu pellet formülünün stabilite sonuçları	142
Çizelge 3.35	İnülin nanopartikülleri ile hazırlanan K ₂ FI18 kodlu pellet formülünün stabilite sonuçları	142
Çizelge 3.36	Farklı formülasyonlardan herbir zaman noktasında SAME plazma konsantrasyonlarının karşılaştırılması	144
Çizelge 3.37	Farklı formülasyonlardan SAME'nin maksimum plazma konsantrasyonlarının karşılaştırılması	144
Çizelge 3.38	Farklı formülasyonlardan herbir zaman noktasında SAME biyoyararlanımlarının karşılaştırılması	145
Çizelge 3.39	Farklı formülasyonlardan SAME T _{max} değerlerinin karşılaştırılması	145

1. GİRİŞ

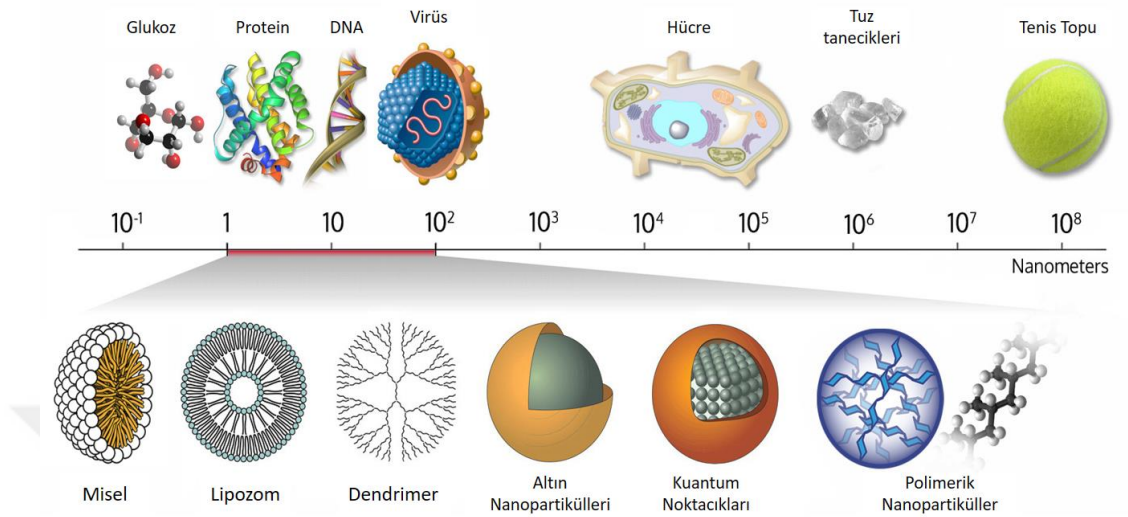
1.1.Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanopartiküller, boyutları 1-1000 nm arasında olan, doğal veya sentetik polimerler, lipid veya fosfolipitler kullanılarak üretilen modern ilaç taşıyıcı sistemleri olarak tanımlanmaktadır. Nanoteknoloji, materyallerin nanometre boyutlarında uygulandığı modern bir yaklaşımdır. Nanoteknolojinin farmasötik uygulamalarında taşıyıcı sistemin partikül büyüklüğünün nano boyutlara düşürülmesi ile bir çok yenilik ve kolaylık sağlanabilmektedir. Nanoteknolojinin farmasötik teknolojideki uygulamalarının bazı avantajları şunlardır (Bilensoy, 2014; Merisko-Liversidge ve Liversidge, 2008; Zırh-Gürsoy, 2014)

- Artan yüzey alanı ve buna bağlı artan çözünürlük
- Artan çözünme hızı
- Artan biyoyararlanım
- Hızlı terapötik yanıt oluşturulması
- Artan yüzey alanı ile dozun azaltılması sağlanırken buna bağlı olarak yan etkilerin azalması,
- Kanseri ve enflamasyonlu bölgelerde kan damarlarının yapıları bozulmakta ve porlar 100-600 nm arasında açılmaktadır. Bu sebeple partikül boyutlarının uygun aralığa getirilerek nanopartiküllerin bu dokularda birikmesinin sağlanabilmesi (pasif hedefleme)
- Yüzey modifikasyonlarına olanak sağlanabilmesi
- Açlık / tokluk ve hastaya bağlı değişkenlerin azaltılması

Farmasötik teknolojide ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan nanopartiküller genel olarak Şekil 1.1'de belirtilen tiplerdir. Tez çalışmasında polimerik

nanopartiküller kullanıldığından dolayı, daha sonraki bölümlerde polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde durulacaktır.



Şekil 1.1. Boyutsal ölçeklendirilmiş sistemde genel olarak kullanılan nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemler (NIOH, 2019).

1.1.1. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller doğal veya sentetik polimerik bir matristen oluşmuş ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Doğal polimerler olarak genellikle protein bazlı polimerler ve polisakkaritler kullanılırken sentetik polimerler olarak biyolojik olarak parçalanabilen polimerler daha çok kullanılmaktadır. Doğal polimerler biyolojik olarak parçalanabilmeleri, biyolojik olarak uyumlu olmaları ve toksik olmamaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında genel olarak kullanılan polimerler Çizelge 1.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında genel olarak kullanılan polimerler.

Protein Bazlı Polimerler	Polisakkaritler	Biyolojik olarak parçalananan Polimerler	Biyolojik olarak parçalanamayan Polimerler
Albümin	Agaroz	Poli-alkil-siyano-akrilat (PACA)	Akrilik polimerler
Jelatin	Aljinat	Poli-D,L-laktit-ko-glikolik asit	Etil vinil asetat
Kolajen	Dekstran	Poli-ε-kaprolakton (PCL)	Polivinil pirolidon
	Heparin	Polilaktik asit (PLA)	Poloksamin
	Hyalüronik asit	Polianhidritler	Poloksamer
	Karagen		Silikonlar
	Kitozan		
	Siklodekstrin		

1.1.1.1.Üretim Yöntemleri

Polimerik nanopartiküller, çok farklı yöntemler ile hazırlanabilmektedir. Bu yöntemler aşağıda özetlenmiştir (Bilensoy, 2014; Li ve ark., 2008; J. Yang ve ark., 2015).

Polimerizasyon: Polimerizasyon nanopartikül oluşturmada yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak nanopartiküller monomerlerden başlayarak emülsiyon ve dispersiyon polimerizasyonu ile üretilmektedir. Monodispers ve homojen partiküller oluşturmaya rağmen katalizör ihtiyacı, yüksek sıcaklık gerektirmesi veya toksik yardımcı maddeler kullanılmasından dolayı bu yöntemin kullanımı sınırlıdır.

Emülsiyon oluşturma / Çözücü buharlaştırma: Etkin madde ve polimerlerin çözünme özelliklerine göre su ile karışmayan uçucu bir çözücü içindeki çözeltilerinin dış faza ilavesi ile tekli emülsiyon veya hidrofilik etkin maddelerin bir organik çözücü içindeki polimer çözeltilerine ilave edilmesini takiben oluşan emülsiyonun ikinci bir sulu faza ilavesi ile çoklu emülsiyonları hazırlanır. Emülsiyon hazırlandıktan sonra yağ

fazındaki organik çözücü uçurularak kolloidal nanopartikül dispersiyonları oluşturulmaktadır.. Nanoemülsiyonlar hazırlandıktan sonra organik faz uçurulurken polimerin sertleşmesini sağlamak üzere çapraz bağlayıcılar ilave edilerek de polimerik nanopartiküller oluşturulabilmektedir.

Koaservasyon: Sıcaklık değişimi, pH, tuz, iyonlar , non-solvan veya geçimli olmayan polimer eklenmesi ile başlangıçta kullanılan polimerin çözünürlüğünün düşürülmesi, böylece oluşan floküle agregatlardan polimerin sertleştirilmesi ile nanopartiküllerin elde edilmesi işlemidir.

Basit koaservasyon tuz, kosolvan, pH gibi parametrelerde değişiklik yapılmasıyla, kompleks koaservasyon ise genellikle zıt yüklü başka bir polimerin ilavesiyle gerçekleştirilmektedir. Disperse edilen bu partiküllerin yapısının korunması amacıyla çeşitli çapraz bağlayıcılar (glutaraldehit, genipin gibi) kullanılır. Bu yöntem peptid-protein yapısındaki polimerlerde ve hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Çözücü kalıntısı riski vardır (Li ve ark., 2008).

Nanoçöktürme (Nanopresipitasyon): Polimerik nanopartiküllerin üretiminde oldukça sık kullanılan ve basit bir yöntemdir. Hidrofobik polimerler suyla karışan organik çözücüde (etanol, aseton, tetrahidrofuran gibi) çözündürülür ve bu çözelti karışmakta olan su fazına eklenir. Organik çözücünün sulu faza difüze olması nedeniyle polimerik nanopartiküller kendiliğinden oluşmaktadır. Hidrofobik etkin maddeler için oldukça uygun bir yöntemdir.

İyonik jelleşme: Bu yöntem iyonik polimerlerden nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Yüklü polimer çözeltisi, zıt yüklü maddenin çözündürüldüğü çözelti içerisine eklendiğinde elektrostatik etkileşim ile nanopartiküller oluşmaktadır. Özellikle katyonik kitozan nanopartiküllerinin oluşumunda anyonik yüklü tripolifosfat sıkça kullanılmaktadır (Bilensoy ve ark., 2009).

Püskürterek kurutma / dondurma: Polimer ve ilaç çözeltisinin, kuru ve sıcak ortamda atomize edilerek katılaştırmasıyla püskürterek kurutma yöntemi uygulanır. Polimerle ilaç çözeltisi erime derecesinin üzerinde atomize edilir ve bu damlacıkların soğuk havayla karşılaşması sonucu katı nanopartiküller oluşturulur. Bu yöntem ise püskürterek dondurma olarak isimlendirilmektedir. Oldukça sık kullanılmakta ve endüstriyel boyutta üretime olanak sağlamaktadır(Demirbolat ve ark., 2018).

Süperkritik sıvı teknolojisi: Kritik sıcaklık ve kritik basınç üzerinde bulunan maddeye süperkritik sıvı denilir. Süperkritik sıvılar hem sıvı hem de gazı ait fizikokimyasal özellikler taşımaktadır. Polimer ve etkin madde süperkritik akışkan (CO₂ gibi) içinde çözülür. Çözelti süperkritik sıvı ekstraktörü içerisinde püskürtülerek çözücünün polimeri çözme etkinliği düşürülmekte ve nanopartiküllerin çökmesi sağlanmaktadır. Bunun için süperkritik sıvıların hızla genişmesi ve süperkritik antisolvan teknikleri uygulanmaktadır (Sun ve ark., 2005).

1.1.2.Nanopartiküller İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

Etkin madde yüklü polimerik nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri ilacın performansını etkileyen önemli faktörlerdir. Bu özellikler ilacın farmakokinetik, farmakodinamik karakteri hakkında fikir vermektedir. Nanopartiküllerin ve polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonunda genel olarak partikül büyüklüğü ve dağılımı, polidispersite indeksi, yüzey yükü, yükleme etkinliği, yüzey morfolojisi ve permeabilite incelenmektedir.

1.1.2.1.Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Nanopartiküler sistemlerin en büyük avantajı azalan partikül boyutuyla orantılı artan yüzey alanına bağlı olarak ilaç etkisinde artıştır. Bu artış hem ilacın etkinliğini

arttırırken hem de vücutta absorpsiyonunu, dağılımını ve atılımını etkilemektedir (Onoue ve ark., 2014). Özellikle partikül boyutu istenen büyüklüğe getirilerek vücutta pasif hedeflendirme de yapılmaktadır (Lamprecht ve ark., 2001; Yıldız ve ark., 2015). Bu sebeple partikül boyutunun belirlenmesi nanopartiküler sistemler için oldukça önemlidir. Lamprecht ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, farklı boyutlardaki (10 µm, 1 µm ve 0,1 µm) floresan işaretli polistiren mikro / nanopartiküller sağlıklı ve ülseratif kolitli sıçanlara uygulanmış ve inflamasyonun ve partikül boyutunun absorpsiyona etkisi incelenmiştir. Partiküller 3 gün boyunca uygulandıktan sonra sıçanlar öldürülerek organlarındaki partikül miktarları saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre inflamasyonlu dokularda birikme, kontrole göre yüksek bulunmuştur. Bunların yanında boyutun da absorpsiyonda oldukça etkili olduğu görülmüştür. Kolonda 10 µm partiküllerin % 1.4 ± 0.6 kontrol grubunda, % 5.2 ± 3.8 'ü kolitli olanlarda; 1 µm partiküllerin % 2.0 ± 0.8 'si kontrol grubunda, % 9.1 ± 4.2 'si kolitli olanlarda; 0,1 µm partiküllerin % $2.2 \pm 1.$ 'si kontrol grubunda, % $14,5 \pm 6,3$ 'si kolitli olanlarda bulunmuştur.

Literatürlerin birçoğunda ve bu tez çalışmasında nanopartiküllerin boyutlarının ölçülmesinde dinamik ışık saçılımı yöntemi (DLS) kullanılmıştır. Foton korelasyon spektroskopisi veya Quasi-elastik ışık saçılımı olarak da bilinen DLS yönteminde su içerisinde disperse olmuş partiküllerin Brown hareketinden faydalanılmaktadır. Boyutlar Brownian hareket ile elde edilen hidrodinamik çap üzerinden tanımlanmaktadır. Sabit dalga boyunda kuvvetli ışığın partiküle çarpıp yaptığı saçılma açısı ve saçılma yoğunluğu foton detektörlerle izlenerek partikül boyutu belirlenmektedir. Zamana bağlı değişen saçılma yoğunluğu ve bu zaman aralıklarındaki dalgalanma yoğunluğundan yola çıkılarak elde edilen difüzyon katsayısı ile Brown hareketi yapan nanopartiküllerin boyutları ölçülmektedir. Küçük partiküller çok dalgalanma gösterirken, büyük partiküller daha az dalgalanma göstermektedir (Kaszuba, 2015; Malvern Instruments, 2019).

Elde edilen veriler ışığında Stokes-Einstein eşitliği uygulanarak partikülün hidrodinamik çapı belirlenmektedir.

$$d_H = \frac{KT}{3\pi\eta D}$$

Eşitlik

1.

- d_H : Hidrodinamik çap (nm)
 K : Boltzman sabiti (J/°K)
 T : Mutlak sıcaklık (°K)
 η : Ortamın vizkozitesi (Pa/sn)
 D : Difüzyon katsayısı (nm²/sn)

Bunların yanında akustik metod, türbidimetrik, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve yüzey morfolojisini incelemek amacıyla kullanılan geçirimli elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile de partiküllerin boyutları ölçülebilmektedir (Roy, 2006). Partiküllerin dağılımların genişliği kümülatif analizlerden elde edilen boyutsuz olarak ölçülen polidispersite indeksi (PDI) ile ifade edilmektedir ve 0 ile 1 arasındadır. Çizelge 1.2’de polidispersite indekslerinin ifade ettiği dispersite düzeyleri verilmektedir (Shaw, 2013).

Çizelge 1.2. Polidispersite indeksleri ve ifade ettiği dispersite düzeyleri.

Polidispersite İndeksi	Yorum
<0,05	Monodispers
<0,08	Hemen hemen monodispers
0,08-0,7	Ortalama PDI değeri
>0,7	Geniş partikül dağılımı

1.1.2.2.Yüzey yükü

Nanopartiküllerin yüzey yükünün belirlenmesinde en çok kullanılan yöntem zeta potansiyelidir. Dispersiyon içindeki bir partikül elektrik alandan geçerken yüzey yüküne zıt olan elektrot tarafına çekilir. Partiküllerin çekilirken yaptığı hız ölçülerek zeta potansiyeli bulunur. Elektroforetik ışık saçılımı adı verilen bu yöntem partiküllerin hızını hesaplamadaki en çok kullanılan yöntemdir. Lazer ışık ile partikülün üzerine ışık dalgası gönderilerek partikülden saçılan ışığın frekansta

oluşturduğu değişim izlenir. Bu değişimden partiküllerin elektroforetik ortamdaki hızı tespit edilir. Elde edilen değer Smoluchowski eşitliğinde (Henry yasası) yerine konularak zeta potansiyel hesaplanır (Eşitlik 2). Kolloidal yüklü dispersiyonların stabilitesinin değerlendirilmesinde kullanılır. Zetametre ile ölçülür ve birimi milivolttur (Malvern Instruments, 2013).

$$\zeta = \frac{4\pi\eta U}{\epsilon} \times 9.10^7 \quad \text{Eşitlik 2.}$$

- ζ : Zeta potansiyel (mV)
 η : Ortamın vizkozitesi (poise)
 ϵ : Dielektrik sabiti
 U : Elektroforetik mobilite ($(v/(\frac{V}{L}))$)
 v : Partikül hızı (cm/sn)
 V : Voltaj (V)
 L : Elektrotlar arası mesafe (cm)

Elde edilen zeta potansiyel değerleri, ± 30 mV'dan fazla ise stabil kabul edilir (Malvern Instruments, 2013).

1.1.2.3.Yüzey morfolojisi

Partiküllerin yüzey özelliklerini belirlemek amacıyla elektron mikroskopları kullanılmaktadır. Bu mikroskoplar TEM ve SEM mikroskoplarıdır. SEM, çok küçük bir alana odaklanan yüksek enerjili elektronlarla yüzeyin taranması prensibiyle çalışmaktadır. TEM, cismin içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülemesi prensibine dayanmaktadır. TEM'de maddelerin iki boyutlu yapısı incelenirken, SEM ile üç boyutlu yüzey özellikleri incelenir. Fakat TEM ile maddenin yapısal özellikleri ve iç yapısı daha net olarak incelenebilmektedir (Gupta ve ark., 2018).

1.1.2.4.Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi

DSC analizi maddelerin termal özelliklerinin incelenmesinde kullanılır. Numune sıcaklığı kontrollü bir şekilde arttırılırken numunedeki özelliğin (ağırlık, enerji, iletkenlik vb.) referans ürüne göre değişikliği ile numunenin termal özellikleri belirlenir. Numunedeki fiziksel özellik değişimlerinin sıcaklığın fonksiyonu olarak ölçüldüğü tekniklerdir. Referans maddeye göre ölçümlerin yapıldığından dolayı “diferansiyel” terimi kullanılmaktadır. En çok kullanılan termal analiz yöntemleri aşağıda verilmiştir:

- Termogravimetri (TG) : Sıcaklık değişimleri sonucu ağırlıkta meydana gelen değişimleri inceler.
- Diferansiyel Termal Analiz (DTA): Sıcaklık değişimine bağlı faz değişimlerini inceler. Diferansiyel Taramalı Analiz (DSC): Sıcaklık değişimini ısıya çevirerek faz değişimlerini inceler.

Termal analiz yöntemleri, maddelerin yapı analizlerinde ve saflıklarının kontrolünde kullanılmaktadır. Farmasötik teknolojide DSC ile etkin madde, yardımcı maddeler ve formüllerin faz değişimleri incelenerek formülasyonun termal karakterlerindeki değişiklikler ve etkin madde:yardımcı madde etkileşimleri incelenmektedir (Düz, 2018; McKinnon, 2014) .

1.1.2.5.X Işını Toz Difraktometresi (XRPD)

Kristal yapı, yapıda bulunan atom veya molekül gruplarının katıya özgü olacak şekilde uzayda belirli bir düzen içindeki sıralı yapısıdır. Bir malzemenin atomik yapısını görüntülemek amacıyla çeşitli elektron mikroskopları kullanılmaktadır. Fakat katıların kristal yapılarını belirlemek amacıyla en çok kullanılan yöntem XRPD yöntemidir. X ışınlarının saçılımları yıkıcı değildir ve numunenin yapısını değiştirmedığından yaygın olarak kullanılmaktadır.

X ışınları katı madde üzerine düşürüldüğünde, ışınlar geliş açılarıyla aynı olacak şekilde yansır ve saçılırlar. Bu saçılımlar kırınım olarak adlandırılır ve Bragg Kanunu ile açıklanır (Eşitlik 3).

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Eşitlik 3.

- n : Kırınım derecesi
 λ : Dalga boyu
d : Düzlemlerarası mesafe
 θ : Kırınım açısı

Bu kırınıma uğrayan ışınların şiddetleri ölçülerek birim hücredeki atomların dizilişleri hakkında bilgi elde edilir, toplanır ve sonuçlara göre desenler elde edilerek analiz edilecek maddenin kristal yapısı belirlenir.

X Işınları genel olarak;

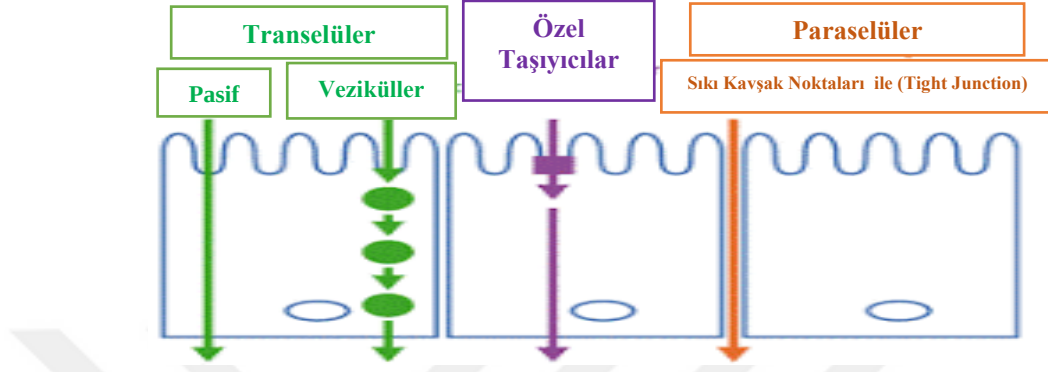
- Kristal ve amorf maddelerin belirlenmesi,
- Kristal veya yarı kristalen maddelerin yapılarının belirlenmesi,
- Bir hücredeki atomların içindeki elektron yoğunluklarının belirlenmesi,
- Tek kristallerin yöneliminin belirlenmesi,
- Çoklu kristallerin içeriğinin belirlenmesi,
- Zorlanma ve küçük boyutlarının ölçülmesi,
- Formülasyonda etkin madde ve yardımcı madde etkileşiminin belirlenmesi,

amaçları için kullanılır (Arslan, 2012; Gökçe, 2012).

1.1.2.7.Permeabilite Çalışmaları

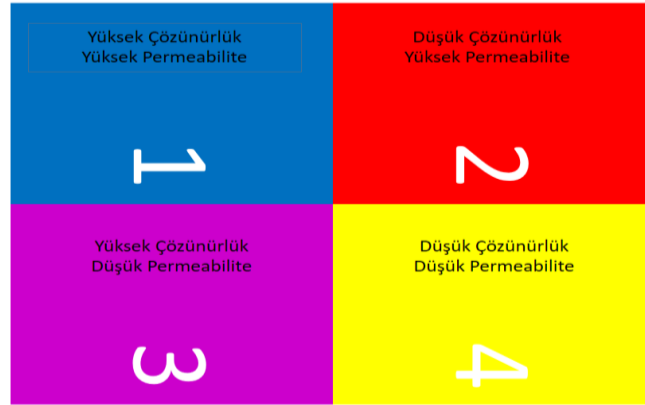
İlacın etkinliği, plazma kan konsantrasyonu ile değerlendirilir. Vücuda giren etkin madde, absorpsiyon-dağılım-metabolizasyon-eliminasyon evrelerinden geçerek vücuttan atılır.

İlk adım olan absorpsiyon, öncelikle vücut sıvılarında çözünen etkin maddenin, biyolojik membranlardan sistemik dolaşıma geçmesiyle permeabilite gerçekleşir. Etkin maddenin biyolojik membranlardan geçişi transelüler, paraselüler ve aktif taşıyıcılar yoluyla gerçekleşmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Membranlardan geçiş mekanizmaları.

Etkin maddeler çözünürlük ve permeabilite özelliklerine göre Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne (BCS) göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.3). Özellikle peptid-protein yapısındaki maddelerin absorpsiyonunda, permeabilite kısıtlayıcı basamak olmaktadır.



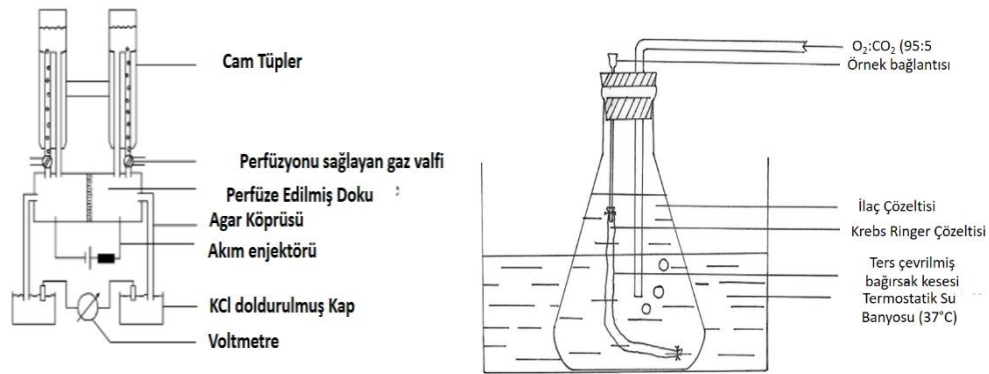
Şekil 1.3. BCS Sınıflandırma sistemi.

Permeabiliteyi arttırmak amacıyla nanosistemlerin kullanımı başlıca yaklaşımdır. Permeabilitesi düşük etkin maddelerin nanotaşıyıcılar içerisine hapsedilerek membranlardaki porlardan paraselüler yollarla ya da çeşitli permeabilite artırıcı ajanlar yardımıyla özel taşıyıcı mekanizma / transelüler yollarla permeasyonu

arttırılabilmektedir(Cano-Cebrián ve ark., 2005; Shaikh ve ark., 2012). Formülasyonların permeabilitelerinin test edilmesi amacıyla çeşitli metodlar uygulanmaktadır. Bu metotlar organizma bütünlüğü açısından karmaşıktan basite olacak şekilde aşağıda ele alınmıştır.

1. *In Vivo Hayvan Modelleri* : Canlı modeli olması açısından gerçekçi absorpsiyon sonuçları alınmaktadır. Permeabilitede rol oynayan absorpsiyon, metabolizma, dışatım (eflüks) pompası gibi mekanizmaların etkisi görülmektedir. Fakat pahalı olması, uygulama zorluğu ve hayvan hakları etiği açısından kısıtlı denek sayısı kullanımını sınırlandıran etmenlerdendir. Bunların yanında bireysel farklılıklar da permeasyonu etkileyen önemli bir faktördür (Shahbazi ve Santos, 2013).

2. *In Situ İntestinal Permeabilite Çalışmaları*: Bu çalışmalarda absorpsiyonun gerçekleştiği bölgeler cerrahi işlemlerle izole edilerek iki ortam arasında membran görevi görerek geçiş çalışmaları yürütülmektedir (Şekil 1.4). Bu amaçla daha çok Ussing Chamber ve ters çevrilmiş bağırsak kesesi (everted gut sacs) yöntemi kullanılmaktadır (Boudry, 2005; Shahbazi ve Santos, 2013).



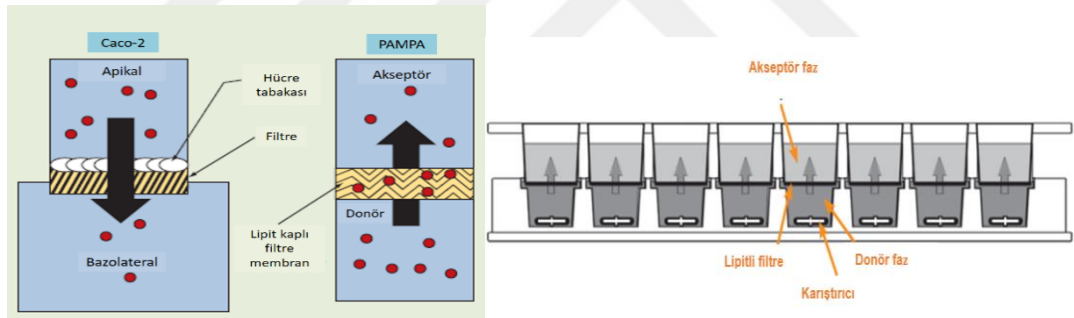
Şekil 1.4. Ussing chamber ve ters çevrilmiş bağırsak kesesi (Luo ve ark., 2013) .

3. *Tek Tabakalı Hücre Kültürü ile Yapılan Permeabilite Çalışmaları*:

Permeabilite çalışmalarında hücre kültürü aktif olarak kullanılmaktadır. MDCK, HT-29 CLAB, 2/48A1 gibi hücre hatlarının kullanımı mevcut olsa da permeabilite

çalışmalarında ağırlıklı olarak CaCo-2 hücre hattı kullanılmaktadır. Caco-2 hücreleri insan kolorektal karsinoma hücreleri olup, ince bağırsaktan geçişin tahmininde kullanılan, uzun yıllardır kullanıldığından yapısı aydınlatılmış, güvenilir bir hücre hattıdır. İntestinal permeabilite için altın seçenek olarak sunulan Caco-2 hücreleri çalışmasından elde edilen görünür permeabilite değeri, transepitelyal permeabiliteyi değerlendirmek amaçlı kullanılır (Shahbazi ve Santos, 2013; van Breemen ve Li, 2005)

4. *Paralel Yapay Membranlar ile Yapılan Permeabilite Çalışmaları (PAMPA-Parallel Artificial Membrane Assay):* PAMPA, Caco-2 transport sistemlerinin daha ucuz bir alternatifi olarak Kansy ve ark.ı (1998) tarafından geliştirilmiştir. Hücre membranlarını taklit etmek amacıyla fosfolipitler kullanılarak permeabilite hakkında fikir edinmek amacıyla kullanılmaktadır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Paralel yapay membranlar.

Bu sistem iki adet kuyucuklu plaktan oluşmaktadır. Bir plağın tabanında porlu filtre bulunur. Diğer plak ise rezervuar görevi görür ve filtreli plakanın tam olarak altına yerleşir. Bu sayede her iki plak filtre temas ederler. Filtre, lipit materyalin organik çözücü içerisindeki çözeltisi ile kaplanır ve permeabilite çalışmaları için yapay membran oluşturulur. Bir plaktaki kuyucuklar donör çözelti (etkin madde gibi) ile doldurulurken diğerine akseptör çözelti (tampon gibi) ilave edilir ve plaklar birbirlerine kenetlenerek inkübe edilir. Donör ve akseptör fazlardaki etkin madde miktarı uygun analiz ile tayin edilerek permeabilite tayin edilir. Bu yapay membranlar deri, kan beyin bariyeri ve intestinal bariyeri taklit edecek şekilde olabilmektedir ve

buna göre permeabilite çalışmalarında kullanılacak lipit türü farklılık gösterilebilmektedir (Seo ve ark., 2006). Bu modelde aktif transport için taşıyıcı sistemler ve membran akış sistemleri olmadığı için sadece transselüler pasif difüzyon ile geçiş belirlenebilmektedir. Pasif difüzyonla absorbe olan maddeler için, PAMPA ve insanda intestinal absorpsiyon arasında çok iyi bir korelasyon gözlemlendiği belirtilmektedir (Chen ve ark., 2012; Shahbazi ve Santos, 2013). Bunların yanısıra ucuz ve otomasyona uygunluğu nedeniyle hücre kültürü geçiş çalışmalarına önemli bir alternatiftir.

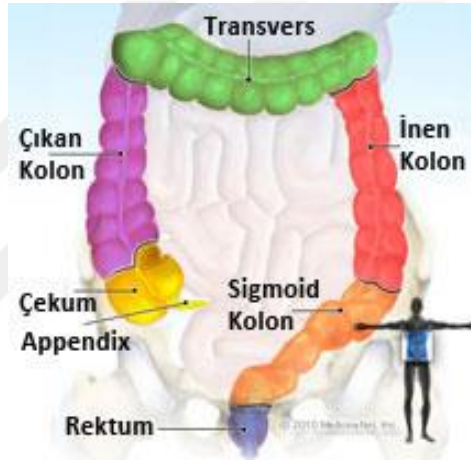
PAMPA ve hücre kültüründe yapılan permeabiliteleri kıyaslamak üzere yapılan çalışmada pasif difüzyonla transelüler yoldan absorbe olan maddeler için PAMPA ve hücre kültüründeki permeabilite sonuçları önemli ölçüde paralel bulunmuştur ($R^2=0,76-0,92$). Oysaki diğer yollarla absorbe olan maddeler için farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlardan bir grup etkin maddenin PAMPA değerleri, hücre kültüründen elde edilenlerden yüksek çıkarken, bir grup ilacın değerleri düşük çıkmıştır. Bu durumun efluks pompası, pH'dan dolayı azalan veya artan difüzyon hız sabiti, aktif transport gibi hücresel aktivite sonucu meydana geldiği belirtilmiştir. Bu sebeple absorpsiyon mekanizmasının aydınlatılması açısından PAMPA ve hücre kültürü çalışmalarının beraber yürütülmesi, elde edilecek sonuçlara göre modifikasyonların yapılması gerektiği belirtilmiştir (Kerns ve ark., 2004).

1.2.Kolona Hedeflendirilmiş İlaç Taşıyıcı Sistemler

Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerle başta kanser olmak üzere birçok iltihabi hastalıklar, sağlıklı dokular zarar görmeden sadece hastalıklı organ / dokuya ulaşarak tedavi edilebilmektedirler. Bu hedef organlardan biri de kolondur. Geçmişte kolon sadece kolondaki lokal iltihabi rahatsızlıkların tedavi bölgesi olarak düşünülüp, ilaç absorpsiyonunun düşük olduğu kabul edilirdi. Farmakosintigrafi ile kolon boyunca önemli derecede absorpsiyon gerçekleştiği görülmüş ve oral yolla kolona hedeflendirilmiş birçok ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir (Gazzaniga, 2013).

1.2.1.Kolon Yapısı ve Fizyolojisi

Kolon, ileuma ileoçekal valf ile bağlanır. Uzunluğu 1.5 m, çapı ortalama 6-7 cm'dir. Apandis, çekum, (ön) çıkan kolon, yatay kolon, inen kolon, sigmoidal kolon, rektum ve anal kanaldan oluşmaktadır (Şekil 1.6). Çıkan kolon ve yatay (transvers) kolonun fizyolojisi farklılık göstermektedir, bu da ilaç absorpsiyonunu etkilemektedir. Lümendeki sıvı içeriği çekumdan rektuma doğru azalmaktadır. Kıvrım ve çıkıntılar olmadığından yüzey alanı ince bağırsağa göre küçüktür. Sindirim amaçlı enzim salgılanması yoktur.



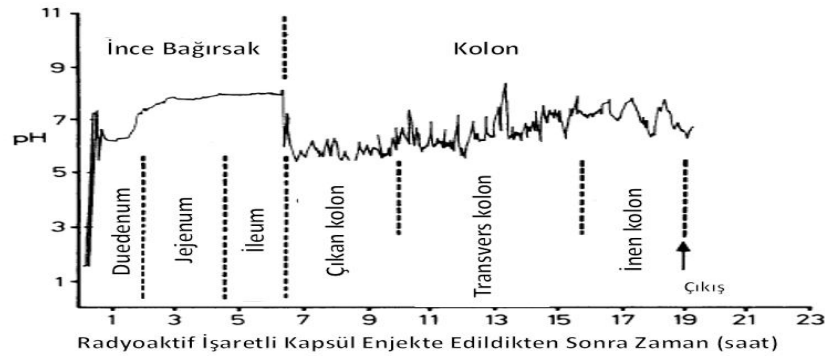
Şekil 1.6. Kolonun yapısı.

Kalın bağırsağın temel görevleri, selüloz, bağırsak sekresyonunun absorplanmayan kısmı, atılan epitel hücreleri ve bakteriler gibi sindirilemeyen materyali elimine etmek, kolonik mikroorganizmalar için uygun ortam oluşturmak, suyu ve elektrolitleri geri absorplamak, K^+ ve HCO_3^- sekresyonu olarak sıralanabilir. Kolona hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler belirli amaçlarla geliştirilmektedir. Bu amaçlar,

- Kolonda meydana gelen hastalıkların lokal olarak tedavisi (Coco ve ark., 2013; Kim ve ark., 2006)
- Gastrointestinal ortamda elimine edilen (enzim ve asidik pH varlığında), sistemik dolaşıma geçemeyen etkin maddelerin verilebilmesi (peptid-protein) (Maroni ve ark., 2012; Patel, 2013)

- Gastrointestinal sistemde ciddi yan etkileri olan etkin maddelerin uygulanması (Paharia ve ark., 2007)
- Geciktirilmiş salım yapan formülasyonların geliştirilmesi (Subudhi ve ark., 2015)
- Absorpsiyon bölgesi kolon olan etkin maddelerin vücuda verilebilmesi (Bautzova ve ark., 2012; Xu ve ark., 2014).
- İlk geçiş etkisi nedeniyle karaciğerde elimine olan etkin maddelerin verilmesi olarak sıralanabilir (Nepolean ve ark., 2012; Varshosaza ve ark., 2012).

Gastrointestinal sistemin pH'sı mideden rektuma kadar değişkenlik gösterir. Bu değerler bireyler içinde ve bireyler arasında farklılık gösterir. Bu farklılık diyet, hastalık ve beslenmeye göre değişmektedir. İn vivo çalışmalarda sıçan kullanıldığı için gastrointestinal kanaldaki pH değerleri insan ve sıçan için Şekil 1.7 ve Çizelge 1.3'te verilmiştir (Evans ve ark., 1998).



Şekil 1.7. Farklı gastrointestinal segmentlerdeki pH değişimi.

Çizelge 1.3. Farklı gastrointestinal segmentlerdeki pH değerleri (Pharmacological Sciences, 2019).

Yer	Ortalama pH (İnsan)	Ortalama pH (Sıçan)
Mide	1,1-1,7	1,93-4,15
Jejunum	6,63±0,53	5.89-7.10
İnce Bağırsağın Orta Kısım	7,41±0,36	
İleum	7,49±0,46	
Çıkan Kolon	6,37±0,58	6.23-6.70
Yatay Kolon	6,61±0,83	
İnen Kolon	7,04±0,67	

Kolonda besinler segmentasyonel kasılmalar ve peristaltik / antiperistaltik hareketlerle ilerler. Yiyecekler çekumda yaklaşık 4 saat durur, fakat kolondan geçiş süresi 6-20 saate kadar değişebilir.

14 sağlıklı insan üzerinde elektromagnetik kapsül verilerek 3D-Transit sistem ile yapılan çalışmada elde edilen gastrointestinal sistemden geçiş süreleri Çizelge 1.4.'te belirtilmiştir (Gregersen ve ark., 2015; Pharmacological Sciences, 2019).

Çizelge 1.4. Farklı gastrointestinal segmentlerden geçiş süreleri .

	İnsan (saat)	Sıçan (saat)
Gastrointestinal geçiş süresi	25,1 (13,1-142,3)	7,51-14,06
Gastik boşalma	3,8 (2,1-5,7)	0,25
İnce bağırsak geçiş süresi	4,4 (1,8-7,2)	1,46-1,82
Çıkan Kolon	3,6 (0,1-46,3)	-
Yatay/İnen Kolon	12,6 (0,8-80,4)	-
Kolorektal geçiş süresi	18,1 (5,0-134,0)	-

1.2.2.Mikrobiyota

Gastrointestinal sistem boyunca farklı özellikte ve miktarlarda büyük bakteri kolonileri vardır. Mikrobiyota denilen bu koloniler mideden rektuma kadar tüm bölgelerde farklı oranlarda bulunmaktadır. Midede nispeten az sayıda, aside dayanıklı gram pozitif aerob bakteriler bulunur. İnce bağırsağın üst kısımlarında mideye benzer özellikte bakteriler bulunurken, çekuma yaklaştıkça gram negatif bakteri oranı artmaktadır. İleoçekal kanaldan sonra bakteri konsantrasyonu ciddi derecede artmakta ve kolon 10^{11} - 10^{12} CFU/mL düzeyinde bakteri florasına sahip olmaktadır. Gastrointestinal sistemde baskın olarak Bacteroides, Clostridiaceae, Fusobacterium, Eubacterium, Ruminococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus, Bifidobacterium ve nispeten daha az olarak Escherichia and Lactobacillus bulunmaktadır (Guarner ve Malagelada, 2003). Sıçan, fare ve primatlarda Bacterioides, Firmicutes, Proteobacteres, Cyanobacteria gibi türlerin farklı oranlarda bulunduğu gösterilmiştir (Nagpal ve ark., 2018)

Kolondaki mikrobiyotanın bugüne kadar görevini sindirilmeyen maddelerin bu bakterilerin enzimleri sayesinde sindirilip, vücuda kazandırılması olarak görülmekteydi. Oysa son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalar, sayesinde her geçen gün kolondaki bakterilerin insan sağlığı üzerine farklı bir etkisini göstermektedir.

Mikrobiyotanın genel olarak 3 ana fonksiyonu vardır (Bull ve Plummer, 2014).

Metabolizma: Kolondaki bakteriler, vitamin sentezleme, tüm esansiyel ve esansiyel olmayan aminoasitlerin sentezi, safranin biyotransformasyonu gibi insanların yapamadığı ya da kısıtlı yapabildiği işleri yapar. Bunun yanı sıra çapraz bağlı nişasta, selüloz, pektin ve zamlar gibi sindirilmeyen karbonhidratları sindirerek dolaşıma katılmasına yardımcı olur. Bu sindirim işlemi sayesinde bakteriyel büyüme ve proliferasyon gerçekleşir.

İmmün sistem gelişimi: İmmün sistemin gelişmesinde de mikrobiyotanın ciddi önemi vardır. Birçok bakteri besin temin etmek amacıyla patojen bakterilerle yarış halindedir. Bu yararlı bakteriler bakteriosin adı verilen antimikrobiyal salgılayarak patojenleri yok ederek kolonizasyonunu önler ve epitel hücreleri üzerinde tabakalanır. Böylece hayatta kalmak adına epitel hücreleri üzerinde koruyucu görevi görür. İntestinal epitelyum immün sistemle dış çevre arasındaki temel ara yüzeydir. Bu nedenle immün sistem, bakteriler ve metabolizasyon ürünlerinden doğrudan etkilenmektedir. Patojenlere karşı mikrobiyota tarafından geliştirilen savunma, reseptörler aracılığıyla immün sinyal oluşturarak immün sistemi uyarır ve koruyucu protein, sitokin ve akyuvarların salınmasına yardımcı olur. Alerjik reaksiyonların da bozulmuş mikrobiyatadan kaynaklandığı iddia edilmektedir.

İntestinal Sistem - Beyin Aksi: Mikrobiyota ve ürünlerinin beyni çift yönlü etkilemesi son yıllarda oldukça heyecan verici gelişmelerdendir. Mikrobiyotaya dayalı bu sistem, otonom sinir sisteminin bir alt grubu olan ve vagus siniri üzerinden beyinle çift yönlü sinyalleşerek davranışlarımızı etkileyen “ikinci beyin” olarak adlandırılan enterik sinir

sistemi (ESS) olarak adlandırılmıştır (Gershon, 1998). Enterik sinir sistemi yaklaşık 500 milyon nörondan oluşmaktadır ve dokuz metre uzunluğundadır. Bağırsak duvarına gömülü olan enterik sinir sistemi, sindirim sistemini düzenlemesinin yanı sıra fiziksel ve zihinsel sağlığı da önemli ölçüde etkilemektedir. Enterik sinir sisteminde duygu yoktur; fakat beyne gönderilen sinyallerle ruhsal durumumuzu etkilediği düşünülmektedir. Örneğin stresin kolon epitelinin bütünlüğünü, peristaltizmi, münin üretimini ve dolayısıyla mikrobiyotayı değiştirdiği görölmüştür.

Yapılan bir araştırmaya göre (2006) kronik depresyonlu 11 hasta üzerinde vagal sinir stimölasyonuyla depresyonda önemli yanıtlar alınmıştır (Corcoran ve ark., 2006; Powley, 2002). ESS, beynin bazı özelliklerine benzerlik göstermektedir:

- Çok çeşitli nöronlardan oluşur ve aralarındaki desteği glial hücreleri sağlar.
- Fizyolojik ortamını dengede tutabilmek için kendine özgü kan - beyin bariyeri vardır.
- Beyinde bulunan aynı tip hormonlar ve 40 çeşit nörotransmitter üretir.
- Bağırsaktaki nöronların kafadakilerle aynı miktarda dopamin ürettiği sanılmaktadır.
- Vücuttaki serotoninin %95'i ESS'deki enterokromafin hücreleri tarafından üretilmekte ve plazmaya salınmaktadır. Bu serotonin vücutta karaciğer ve akciğerlerdeki hasarlı hücreleri de onarmaktadır.

Bu sebeplerden dolayı sağlıksız ve tam gelişememiş bir ESS'nin, sadece hazımsızlık değil, ruhsal durumumuz başta olmak üzere obezite, diyabet, Alzheimer gibi birçok kronik hastalığa sebep olacağı düşünölmektedir. Spastik kolit hastalığının en belirgin semptomları kronik karın ağrısı, diyare veya kabızlıktır. En önemlisi bu semptomlara depresyonun da eşlik etmesidir (Wood ve ark., 2012). Bu çalışmalar ışığında son yıllarda kolon sağlığının ruhsal duruma etkisi üzerinde ciddi çalışmalar yapılmış ve yapılan çalışmalara göre enterik mikroflora ile beyin fonksiyonları arasında ciddi bir bağlantı bulunmuştur. Sıçanlarda prebiyotik enjeksiyonuyla, mikroflora ile depresyon ve anksiyete arasında bağlantı olduğu kanıtlanmıştır (Carabottia ve ark., 2015; Gruenwald ve ark., 2002; Rhee ve ark., 2009). Oxford

Üniversitesi'nde 2014 Aralık ayında 45 sağlıklı gönüllü üzerinde yapılan çalışmada, gönüllülerin yarısına üç hafta boyunca hergün piyasada mevcut bulunan iki prebiyotik, Bimuno® -galaktooligosakkarit (B-GOS) ve fruktooligosakkarit (FOS), diğer yarısına ise plasebo uygulanmıştır. B-GOS, plaseboya göre nöroendokrin stres cevabını düşürmüştür ve önceki çalışmalardaki mikrobiyota proliferasyonu ile hormonal ve anksiyolitik etki ilişkisi insanlarda da kanıtlanmıştır. Stres - ilişkili hastalıklarda B-GOS'un yararlılığını test etmek için ilave çalışmaların gerekliliği de belirtilmiştir (Schmidt ve ark., 2015).

Bu çalışmada prebiyotik özellikteki oligo- ve polisakkaritlerin kullanılması ile mikrobiyota üzerine yararlı etki sağlanarak SAME'nin depresyon tedavisindeki etkinliğine katkıda bulunulması hedeflenmiştir (enterik sinir sistemi-beyin ilişkisi).

Bu fonksiyonlarının sonucu olarak mikrobiyotanın doğrudan ya da dolaylı etkilediği bazı hastalıklar ve oluşum mekanizması Çizelge 1.5'da belirtilmiştir.

1.2.3.Kolonik İlaç salım Stratejileri

Kolona ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımı yapılırken kolonun genel özellikleri gözönünde bulundurulur. Bu kapsamda genel olarak üç yaklaşım mevcuttur. Bu yaklaşımlar 1) pH duyarlı sistemler, 2) mikrobiyota aktivasyonuna dayanan sistemler, 3) zaman kontrollü sistemlerdir. Bu sistemlerin yanında bu yaklaşımların kombine edildiği sistemler de geliştirilmektedir (pH ve mikrobiyal enzim kontrollü sistemler).

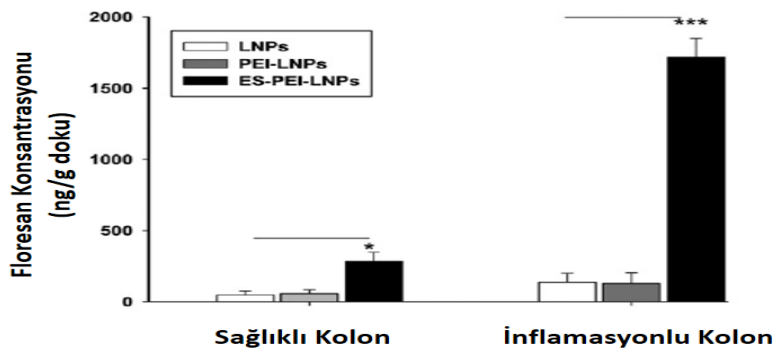
Çizelge 1.5. Çeşitli hastalıklarda mikrobiyotanın rolü.

Hastalık	Mikrobiyotanın Etkisi
Akciğer Rahatsızlıkları	- Mikrobiyota tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitleri aracılığıyla immün cevabı artırarak akciğerlerdeki alerjik inflamasyon önlenir (Trompette ve ark., 2014).
Alerjik rahatsızlıklar	- Mikrobiyota tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitleri aracılığıyla immün cevabı artırarak alerjik inflamasyon önlenir (Trompette ve ark., 2014). - Verilen sinyallerle T hücrelerinin üretimi düzenlenir (Wang ve ark., 2017).
Böbrek Rahatsızlıkları	- Bozulmuş mikrobiyota sonucu Trimetilamin-N-oksit salımının artırmaktadır. - Bozulmuş mikrobiyota üretimi azalan kısa zincirli yağ asitleri iskele nedeniyle böbrek rahatsızlıklarına neden olmaktadır (Antzaa ve ark., 2018).
Gastrik Kanseri	- Gastrik kanserin en büyük sebebi olan Helicobacter pylori suşları ve belirteci olan sitotoksin kaynaklı antijen A (CagA) ve vakuollü sitotoksin (VacA) gastrik kanseri tetiklemektedir (Wang ve ark., 2017).
Hipertansiyon	- Bozulmuş mikrobiyota sonucu Trimetilamin-N-oksit, GLP-1 ve gastrin salımının artması hipertansiyona neden olmaktadır. - Bozulmuş mikrobiyota sonucu damarlarda koruyucu etkili kısa zincirli yağ asitleri üretimi azalmaktadır. - Hipertansiyon nedenlerinden obezite oluşumu tetiklenmektedir (Antzaa ve ark., 2018; Jose ve Raj, 2015).
Karaciğer hastalıkları	- Mikrobiyota ürünleri olan etanol, amonyak ve asetaldehit ile karaciğer fonksiyonları doğrudan etkilenmektedir. Bu ürünler endotoksin salımı ve karaciğer metabolizması üzerinde etkilidir (gut-liver axis) (Wang ve ark., 2017).
Kolorektal Kanseri	- Kolon epitelinin patojenlere açık hale gelmesinden ve koruyucu etkilerin azalmasından dolayı toksinlere ve serbest radikallere maruziyet kolorektal kansere sebep olmaktadır (Wang ve ark., 2017).
Obezite	- Homeostazis, enerji metabolizması, asetat, safra ve intestinal hormon salımı gibi metabolik ve fizyolojik yolların bozulması obeziteye neden olmaktadır (Gao ve ark., 2017).
Tip 2 Diyabet	- Bozulan mikrobiyota dengesiyle metabolik reaksiyonların bozulmakta ve Prevotella copri ve Bacteroides vulgaris gibi bakteriler ile de insülin direnci tetiklenerek Tip 2 diyabete sebep olmaktadır (Wang ve ark., 2017).
Psikiyatrik Rahatsızlıklar	- Enterik sinir sistemi yoluyla mikrobiyotadaki değişimlerin beyni ve duyu durumunu çift yönlü etkilediği kanıtlanmıştır (n=1054) (Valles-Colomer ve ark., 2019).

1.2.3.1.pH Duyarlı Sistemler

Gastrointestinal kanalın pH'sı mideden rektuma doğru Şekil.1.7'de belirtildiği gibi değişiklik göstermektedir. Bu pH farklılığı gözönünde bulundurularak pH duyarlı polimerler kullanılarak kolona hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bu amaçla en çok kullanılan polimerler polivinil asetat ftalat (PVAP), hidroksipropil metilselüloz ftalat (HPMCP), hidroksipropil metilselüloz asetat süksinat (HPMCAS), metakrilik asit kopolimeri (Eudragit L100-55), metakrilik asit kopolimeri dispersiyonu, (Eudragit L30D-55), Eudragit L100, Eudragit S100, selüloz asetat ftalat (CAP), şellak olarak sıralanabilir.

Naeem ve ark.'nın (2018) yaptıkları çalışmada bu polimerlerden Eudragit S100 kullanılarak kolondaki inflamasyonlu bölgeye hedefleme yapılmıştır. Üretilen lipid nanopartiküller (LNPs) önce katyonik polietilenimin (PEI) ile daha sonra kolona hedeflemek amacıyla Eudragit S100 (ES) ile kaplanmıştır. Sırasıyla 211 ± 17 nm , 243 ± 11 nm ve 302 ± 13 nm boyutunda üretilen nanopartiküller sırasıyla % 64 ± 2.5 , % 63 ± 3.0 ve % 58 ± 5.2 oranda floresanla yüklenmişlerdir. Bu üretilen formüller sağlıklı ve kolit yapılmış farelere uygulanarak gastrointestinal sistemdeki analizi biyogörüntüleme ve konfokal mikroskopla incelenmiştir. Eudragit S100 ile kaplanmış nanopartiküllerin hastalıklı ve sağlıklı fareden en yüksek oranda kolonda biriktiği görülmüş, inflamasyonlu kolonda daha çok biriktiği görülmüştür (Şekil 1.8). Böylece pH hedeflemeyle kolondaki inflamasyonlu dokularda etkili tedavinin gerçekleştirilebileceği görülmüştür.



Şekil 1.8. Yapılan çalışmada farklı formülasyonların dokulardaki konsantrasyonu(Naeem ve ark., 2018)

Asfour ve ark. (2018) tarafından yürütülen çalışmada kolon kanserini tedavi etmek amacıyla rutin yüklenmiş Eudragit S100 nanopartikül sistemleri geliştirilmiştir. Farklı etkin madde:polimer oranları kullanılarak, nanopresipitasyon yoluyla üretilen nanopartikül sistemler, Poloksamer 188 ile stabilize edilerek hazırlanmıştır. %94,19-98,1 yüklenme etkinliğine sahip, 154,9- 968,6 nm büyüklüğünde nanopartiküller elde edilmiştir. Bu nanopartiküller üzerinde yapılan çözünme hızı çalışmaları 0,1 N HCl ortamında 2 saat, pH 6.8’de 3 saat daha sonra 24. saate kadar pH 7,4 ortamında yürütülmüştür. İlk 2 saatte çözünen etkin madde miktarı % 2,68 iken 24. saatin sonunda pH 7,4’de % 84,99 olmuştur. Bunların yanında rutin kolon kanseri hücrelerindeki (HCT-116) sitotoksikite çalışmasına göre normal rutine göre nanopartikül formülasyonu 2 kat yüksek sitotoksik etki göstermiştir.

1.2.3.2.Mikrobiyal Parçalanma ile Salınan Sistemler

Kolon mikroflorasındaki enzim aktivasyonuna dayanmaktadır. Ön ilaç şeklinde ve biyolojik olarak parçalanarak polimerlerle olmak üzere iki şekilde hazırlanabilir.

Ön İlaç Yaklaşımı: Konjugasyonla farklı yardımcı gruplar bağlanmış etkin madde etkisizdir. Bu sistemin mikrobiyotadaki bakterilerin enzimleriyle degrade olarak fonksiyonel gruptan ayrılması ve açığa çıkmasıyla etkin madde terapötik etkisini göstermektedir. 1942 yılına kadar sadece romatid artrit için kullanılan sülfasalazin ön ilaç şeklinde olduğu asıl etki gösteren kısmın azo bağıyla bağlı 5-aminosalisilik asit olduğu ve enzimlerin etkisiyle parçalandıktan sonra açığa çıktığı kanıtlanmıştır. Azoredüktazların en yüksek olduğu bölge kolon olduğundan, kolondaki inflamasyonlu hastalıklar için iyi bir tedavi olduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmadan yola çıkarak kolondaki enzimler tarafından metabolize edilen ön ilaç tasarımları geliştirilmiştir. Kolona hedeflendirilmek amacıyla yapılan bazı ön ilaç sistemlerinin özeti Çizelge 1.6’da belirtilmiştir.

Çizelge 1.6. Kolona hedeflendirilmiş bazı ön ilaç çalışmaları.

	Etkin madde	Yapılan çalışmalar
Azo konjugasyonu	5-Aminosalisilik asit	(Jain ve ark., 2008)
Siklodekstrin konjugasyonu	Bifenilil asetik asit	(Hirayama ve ark., 1996)
Dekstran konjugasyonu	5-Aminosalisilik asit	(Shrivastava ve ark., 2013)
Lektin konjugasyonu	Doksorubisin	(Minko, 2004; Wirth ve ark., 1998)

Polimerlerin kullanımı: Kolonda yer alan azoredüktaz enzimleri ile metabolize olabilen, yapılarında azo bağı içeren polimerler kolona hedeflendirilme sistemlerinde kullanılmaktadır. Polietilen glikol, m,m'-di(hidroksimetil)azobenzen ve 1,2 propanediol monomerleri kullanılarak farklı oranlarda azo bağı içeren poliüretan polimerler üretilmiştir. Farklı çözünürlüğe sahip iki etkin madde (ONO-3708 ve OKY-046) çeşitli yardımcı maddeler kullanılarak kaplama kazanında inert pelletler üzerine kaplanmıştır. Daha sonra alt kaplama olarak karboksimetil etil selüloz ve ardından azo bağı içeren farklı poliüretan polimerleri ile kaplanmıştır. İntestinal flora içeren ve içermeyen ortamlarda yapılan çözünme hızı çalışmalarına göre etkin maddelerin erken salımı etkili bir şekilde geciktirilmiş ve salım doğrudan floraya dayalı olarak değişmiştir. Etkin maddenin çözünme hızı ise etkin maddenin hidrofilliğine ve polimerin tipine göre değişmiştir (Yamaoka ve ark., 2000).

Ma ve ark. (2016) tarafından kolona hedeflendirilmiş misel sistemleri üretmek amacıyla azo bağı içeren, yıldız şekilli amfifilik polimer sentezlemişlerdir. Yıldız-PCL-azo-mPEG@(sPCEG-azo)@(yıldız şekilli PCL (polikaprolakton))@mPEG (metoksipolietilenglikol) @ olsalazin miseller sentezlenmiş ve dimetil fumarat etkin maddesi yüklenmiştir. Misellerin ortalama çapı 153,6 nm iken polidispersite indeksi 0,195'tir. Yapılan çözünme hızı çalışmalarında, mide ortamında 10 saat içinde etkin madde çıkışı % 20'yi geçmezken, kolon ortamında ilk 2 saatte % 60, 10. saatin sonunda % 100 olmaktadır. Sitotoksosite göstermeyen azo bağı misel sistemi kolona hedeflendirmede oldukça başarılı bulunmuştur.

1.2.3.3.Zaman Kontrollü Sistemler

Etkin maddenin kolonda açığa çıkması için mideden ve ince bağırsaktan geçmesi belirli bir süre almaktadır (Çizelge 1.4). Bu nedenle kolona hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, geciktirilmiş salım sistemlerine girmektedir. Kolona ilaç salımındaki zaman kontrollü yaklaşım, etkin maddenin hidrofobik polimerler kullanılarak salımının geciktirilmesi şeklinde tanımlanabilmektedir.

Nagaraja ve ark. (2013) tarafından yürütülen çalışmada zaman kontrollü salım sağlamak amacıyla mikropartikül sistemi geliştirmişlerdir. Losartan potasyum (LP) hipertansiyonda kullanılan, düşük yarı ömüre sahip (1,5-2 saat), yüksek ilk geçiş etkisine uğrayan anjiyotensin II reseptör blokörüdür. Kullanım sıklığı ve biyoyararlanımı arttırmak amacıyla kolonda pulsatil salım yapan mikrosistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. LP, Eudragit L100 ve Eudragit S100'den oluşan mikropartikül sistemine çözücü buharlaştırma yöntemi ile yüklenmiştir. Daha sonra bu mikropartiküller çeşitli hidrojel oluşturuca ajan ile sert jelatin kapsüllere konulmuş, % 5 etil selülozun alkol çözeltisiyle kapatılmış (sealing) ve sistemin kolonda çözünmesi amacıyla kapsül, % 5 selüloz asetat ftalat ile kaplanmıştır. Kaplama % 8-12 ağırlık artışı olana kadar devam edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. 135-655 µm büyüklüğünde elde edilen partiküller, 23°95'' - 30°40'' arası yığın açısına ve % 68,93±0,37 - 80,12±0,62 yükleme etkinliğine sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan çözünme hızı çalışmalarına göre mikropartiküllerin pH 6,8 fosfat tamponunda 12. saat sonunda etkin maddenin % 84,96±1,53 ile 98,45±0,24'ünü saldığı bulunmuştur. Daha sonra bu mikropartiküller kapsüllere doldurularak, %5 selüloz asetat ftalat ile kaplanarak kolonda salım yapan sistemler geliştirilmiştir.

1.2.3.4.Kombine Sistemler

Genel olarak her sistemin bazı avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Bu dezavantajlı durum, sistemlerin kombine kullanımıyla aşılmaktadır.

Kolondaki pH değerleri kişilerarası, hastalık, diyet ve beslenmeye göre değişmektedir. Bu sebeple pH hedefli sistemler amacına ulaşamayabilmektedir. Bunu engellemek amacıyla bu sistemler başka yaklaşımlarla kombine edilebilmektedir (Gupta ve arkadaşları) pH ve zaman duyarlı polimerler kullanarak kolona hedeflendirilmiş pelletler geliştirilmiştir. Yapılan çalışmada 5-aminosalisilik asit kaplama kazanında inert pelletlerin üzerine kaplanmıştır. Daha sonra iç tabakada pH bağımsız, zaman kontrollü salım yapan Eudragit RL ve Eudragit RS (2:8) ile dış tabakada pH duyarlı çözünen Eudragit FS ile kaplanarak pH ve zaman kontrollü salım yapan pellet sistemleri geliştirilmiştir. Çözünme hızı çalışmaları sırasıyla pH 1,2’de, 2 saat; ardından pH 6,5, 7,0 ve 7,5’te olmak üzere 3 ortamda 12 saat yürütülmüştür. pH 6,5’te hiç salım görülmezken pH 7,5’te pH 7,0’de olduğundan daha hızlı bir salım elde edilmiştir. Bu değerlerin gastrointestinal sistem pH’sına benzerliğinden dolayı yapılan çalışmanın kolona hedeflenmiş ilaç taşıyıcı sistemler amacıyla kullanılabileceği düşünülmüştür (Gupta ve ark., 2001).

Mikrobiyal enzimlerle parçalanarak genel olarak kolona hedeflendirmede sıkça kullanılmaktadır. Fakat bu amaçla kullanılan bazı polimerler (inülin, pektin, zank) hidrojel yapısında olduğundan dolayı su ile karşılaştığında jelleşerek etkin maddenin ortama sızmasına sebep olabilmektedir. Özellikle suda çözünen etkin maddeler bu sistemlerden kolaylıkla sızabilmektedir. Bu amaçla ya enterik polimerle ya da hidrofobik polimerle kombine uygulanarak kolona ulaşmadan etkin maddenin sızması engellenmektedir.

Subudhi ve ark. (2015) tarafından yürütülen çalışmada 5-florourasil maddesi iyonik jelasyonla pektin nanopartikülleri içerisine yüklenmiştir. Daha sonra enterik polimer olan Eudragit S100 ile kaplanmıştır. Nanopartiküller partikül boyutu, zeta potansiyeli açısından genel karakterizasyonu yapılmıştır. Yapılan çözünme hızı çalışmalarına göre 24. saat sonunda kaplı nanopartiküllerden etkin maddenin % 70’i açığa çıkmıştır. Yapılan in vivo çalışmaların sonuçlarına göre kolondaki etkin madde konsantrasyonu, kaplı nanopartiküller için $92,90 \pm 4,65$ iken, 5-FU çözeltisi için $15,09 \pm 1,88$ ve kaplanmamış nanopartiküller için $62,47 \pm 3,65$ olarak bulunmuştur.

Varum ve ark. (2011) tarafından ekstrüzyon-siferonizasyon yöntemiyle mukoadeziv polimerleri (Carbopol 971P, Carbopol974P, Polycarbophil AA-1) kullanarak prednisolon yüklü pelletler elde edilmiştir. Bu pelletler alttan püskürtmeli akışkan yatakta ilk olarak kısmen nötralize edilmiş Eudragit S (pH 7’de çözünmeye başlar) ve tampon tuzu ile daha sonra sadece Eudragit S ile kaplanmıştır. Kaplanmamış, tek tabakalı kaplanmış ve iki tabaka kaplanmış olmak üzere formüller üretilmiştir. Ex vivo mukoadezyon çalışmalarına göre çift katlı kaplanmış formül, tek tabakalı kaplanmış formüle göre daha adeziv bulunmuştur. Pelletler 0,1 N HCl’de 2 saat ve sonrasında 4 saat boyunca pH 7,4 Krebs bikarbonat tamponunda tutularak çözünme hızı çalışmaları yapılmıştır. Kaplama tabakalarına konulan floresan işaretleyicilerle konfokal lazer tarayıcı mikroskopla kaplamanın çözünmesi izlenmiştir. Kaplanmamış pelletler ilk 2 saatte etkin maddenin % 80’inden fazlasını salarken, kaplı formüllerden % 5 civarında çıkmıştır. Tek tabakalı kaplamadan çıkış Krebs tamponunda 2. saatten sonra gerçekleşirken, çift katlı kaplamadan 75 dakika sonra gerçekleşmeye başlamıştır. Sonuç olarak kolonda etkin maddeyi salabilen ve adezyon özelliğiyle biyoyararlanımın arttırıldığı kolona hedeflendirilmiş bir formül geliştirilmiştir.

1.3.Kaplama Teknolojisi

Kaplama, ilaca fonksiyonel veya fonksiyonel olmayan (görüntü, tat, şekil...) özellik kazandırmak amacıyla çeşitli materyaller kullanılarak uygulanan işlemdir. İlaç teknolojisinde kaplama, uzun yıllardır uygulanan, işlem adımları tanımlanmış ve optimize edilmiş bir prosestir. Kaplama i)şeker kaplama, ii)film kaplama, iii)basınçla kaplama, iv)eriterek kaplama (hot melt), v)kuru toz kaplama vb. gibi şekillerde yapılabilmektedir. Kaplamanın avantajları ise şu şekilde sıralanabilir:

- Organoleptik özellikleri iyileştirilmektedir.
- Hasta uyuncu arttırılmaktadır.
- Etkin maddenin ısı, ışık ve nemden korunması sağlanmaktadır.

- İlacın üretimi, paketlenmesi ve taşınması sırasında fiziksel ve kimyasal stabilitesi arttırılmaktadır.
- Etkin maddenin dozaj formundan salım özellikleri değiştirilebilmektedir.

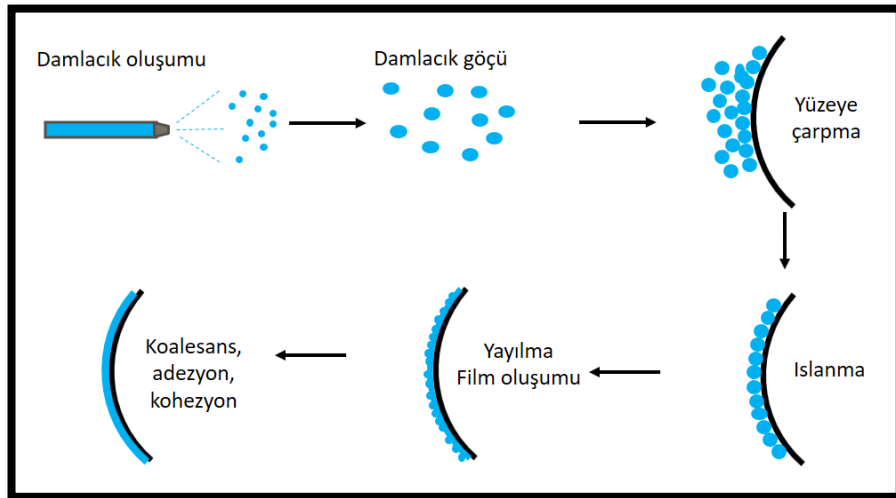
1.3.1.Film kaplama

Kaplama sıvısının çekirdek üzerinde homojen film halinde kaplanması işlemidir.

- ✓ Kaplama kalınlığı ve süresinin kısa, dolayısıyla ucuz olması,
- ✓ Çekirdek geometrisinin şeker kaplamaya göre daha az önemli olması,
- ✓ Tablet üzerinde işaret ve yazıların kapanmaması,
- ✓ Otomasyona uygun olması,
- ✓ Kontrollü salıma olanak vermesi,

gibi avantajları dolayısıyla günümüzde şeker kaplamanın yerini almıştır ve ilaç endüstrisinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Film kaplama etkin madde salımını modifiye etmek amacıyla fonksiyonel veya estetik görünümü düzeltmek ve tat-koku maskelemek amacıyla fonksiyonel olmayan amaçla uygulanabilmektedir. Film oluşum mekanizması genel olarak Şekil 1.9'da verildiği şekilde gerçekleşmektedir (Dortunç, 2004; Yüksel, 2014).



Şekil 1.9. Film kaplama aşamaları.

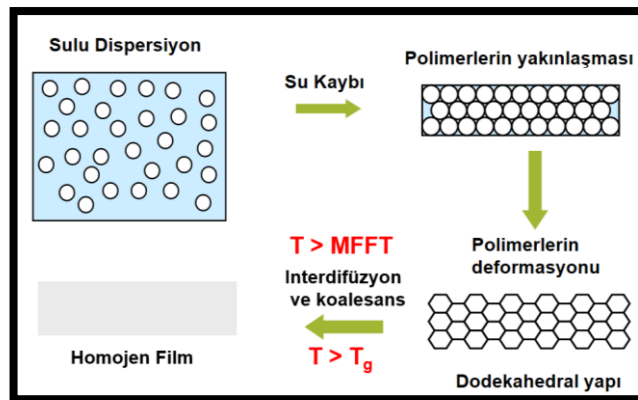
Film kaplamada genel olarak kullanılan polimerler Çizelge 1.7’de belirtilmiştir.

Çizelge1.7. Film kaplamada kullanılan bazı polimerler.

Selüloz esterleri
• Selüloz asetat ftalat
• Hidroksiopropilmetilselüloz ftalat
• Karboksimetil etil selüloz
• Etil selüloz
Metakrilik Asit Kopolimerleri
• Eudragit E
• Eudragit R /S
• Eudragit NE
Polivinil Asetat Ftalat

Film kaplama, polimerlerin organik çözücülerdeki çözeltileri veya sulu dispersiyonları ile oluşturulmaktadır. Polimerlerin organik solvandaki çözeltileri çekirdek üzerine püskürtülerek Şekil 1.9’deki mekanizmayla kaplama gerçekleştirilmektedir.

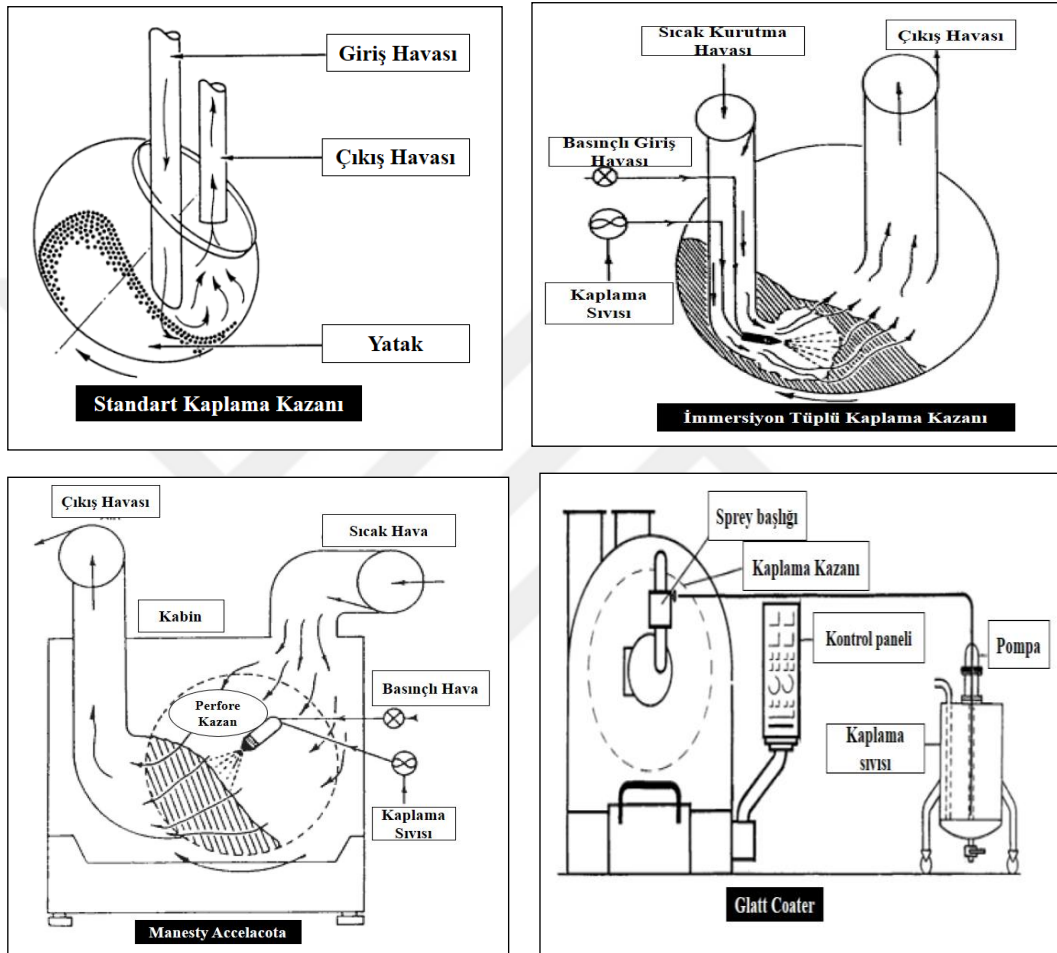
Yapılarındaki organik çözücülerin toksik etkisi, filmlerdeki çözücü kalıntıları, çevre kirliliği riski ve çalışanların maruziyeti gibi sebeplerden dolayı bu polimerlerin su içerisinde kolloidal dispersiyonları daha çok tercih edilmeye başlamıştır. Bu dispersiyonlar çözeltiler gibi uygulanmaktadır; fakat film oluşum mekanizması Şekil 1.10’da verildiği üzere farklıdır (Maroni ve ark., 2013).



Şekil 1.10. Sulu dispersiyonun film oluşturma mekanizması (T:sıcaklık, T_g :Camsı geçiş sıcaklığı, MFFT: minimum film oluşum sıcaklığı) (Keddie, 2019).

1.3.2.Kaplamada Kullanılan Cihazlar

Kaplama işlemi için klasik kaplama kazanları ve akışkan yatak sistemleri kullanılmaktadır. Klasik kaplama kazanları Şekil 1.11’te verilmiştir (Cole, 2002).



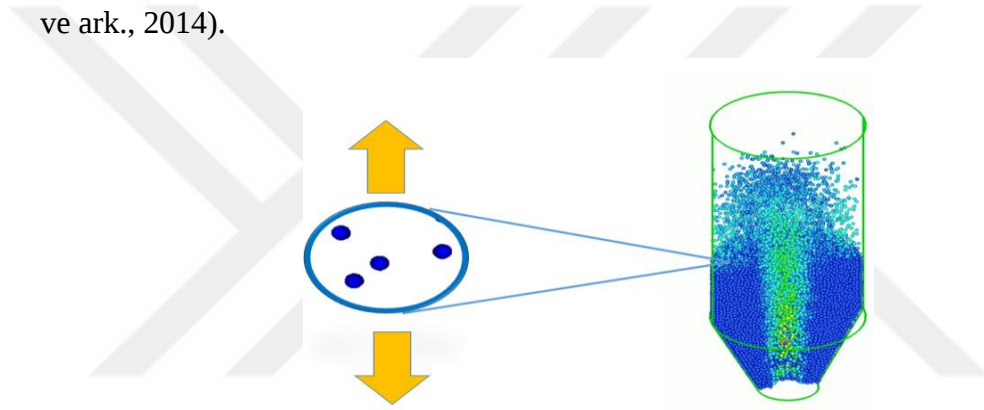
Şekil 1.11. Kaplamada kullanılan klasik kaplama kazanları (Cole, 2002).

1.3.3.Akışkan Yatak Sisteminde Kaplama İşlemi

Akışkan yatak ilaç teknolojisinde pelletlerin, granüllerin ve tabletlerin kaplanmasında oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Mekanizması, temel olarak belirli bir prosesden geçen havanın akışkan hale getirdiği çekirdek üzerine kaplama sıvısının püskürtülüp film şeklinde kaplanması şeklindedir.

1.3.3.1.Akışkanlık

Kaplama işleminin gerçekleşmesi için partiküllerin akış özelliklerinin bilinmesi gerekmekte ve buna uygun hızda havanın gönderilmesi gerekmektedir. Düşük olduğunda partiküller akışkanlaşamayacak, yüksek olduğunda ise pnömatik transport geçilerek partiküller filtrelelere yapışacaktır. Partiküllerin akışının olduğu minimum hıza minimum akışkanlaştırma hızı (U_{mf}) denir ve bu nokta yerçekimiyle sürtünme kuvvetinin eşit olduğu, partiküllerin havada asılı kaldığı noktadır (Şekil 1.12). Partiküllerin boyut, şekil ve dansitesine göre değişir. U_{mf} 'yi belirlemek için genel olarak manometre yardımıyla ölçülen basıncın düşme değeri kullanılmaktadır (Badday ve ark., 2014).

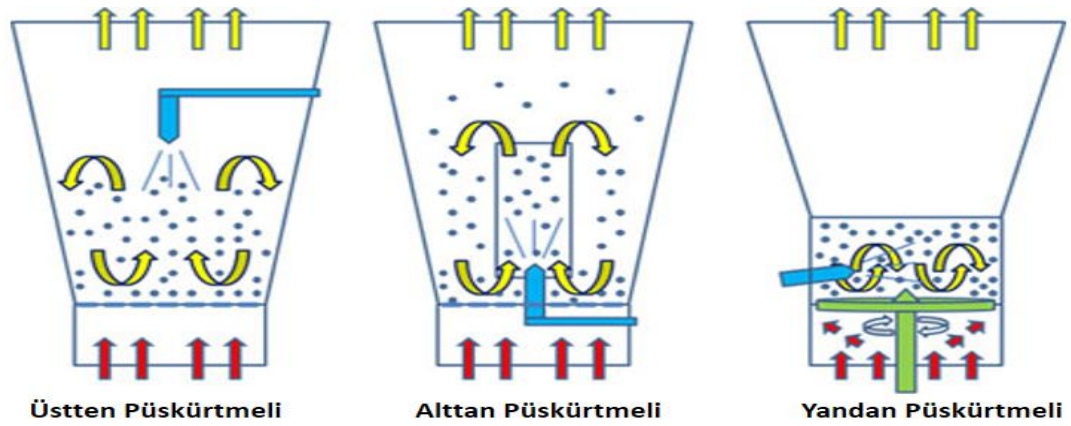


Şekil 1.12. Tozların akışkanlaştırılması.

Tozlar akış özellikleri açısından Geldart sınıflandırmasına göre 4 gruba ayrılmaktadır. Geldart sınıflandırması partikül boyutu ve dansiteye dayanmaktadır. Farmasötik tozların dansitesi genel olarak $1,5 \text{ g/cm}^3$ dür, bundan dolayı $900 \mu\text{m}$ 'den büyük tozlar D, $900\text{-}150 \mu\text{m}$ arası B, $150\text{-}20 \mu\text{m}$ arası A, $20\mu\text{m}$ den küçük olanlar C tipi olarak sınıflandırılır. A ve C kohezif ve adezif tozlardır; bundan dolayı B ve D tipine aglomere olarak serbest akış özelliği kazanabilmektedirler (Ichikawa ve Fukumori, 1991). Bu amaçla bu tür tozların yüzeyine nanoboyutlu partiküller kuru kaplama işlemi ile kaplanabilmektedir. Chen ve arkadaşları partiküller arası çekim kuvvetini düşürmek amacıyla, C tipi tozu, nanopartiküllerle ön kaplama yaparak akışkanlığını arttırmış daha sonra kolaylıkla granülasyon / kaplama işlemini uygulamışlardır (Chen ve ark., 2009a; Chen ve ark, 2009b).

1.3.3.2.Akışkan Yatak Sisteminin Tipleri

Akışkan yatak sistemleri püskürtme başlığının konfigürasyonuna göre Şekil 1.13’de gösterildiği gibi üç farklı şekilde olabilmektedir. Bu farklı tipler aynı akışkan yatak sisteminin farklı insertleri şeklinde bulunabilmektedir.



Şekil 1.13. Akışkan Yatak Tipleri (Pharmaspray, 2019).

Üstten Püskürtmeli Akışkan Yatak Sistemi

Bu sistem granülasyon işleminde sıkça kullanılsa da kaplama işleminde de kullanılmaktadır. Özellikle 100 µm boyutundaki küçük partiküllerin kaplanmasında başarıyla kullanılmıştır (Jones, 1988). Kaplama sıvısı püskürtüldükten sonra oluşan aglomeratlar yerçekimi etkisi ile dibe doğru alçalırken küçük partiküller havada kalır. Genel olarak homojen bir partikül dağılımı elde etmek kolaydır. Ancak, istenmeyen büyüklükte aglomerasyon riski yüksektir; bunu engellemek için düşük kaplama sıvısı püskürtme hızı veya sisteme giren hava miktarının artırılması gerekmektedir. (Dewettinck ve Huyghebaert, 1998).

Altan Püskürtmeli Akışkan Yatak Sistemi

Kaplamada en çok kullanılan yöntemdir. Üstten püskürtmeli sisteme göre farkı, ürün kabında alt kısmında bir silindirik partisyonun bulunmasıdır . Kaplama sıvısı,

ürün kabı dibinde bulunan sprej başlığından bu partisyondan içine doğru püskürtülmektedir. Püskürtme kalıbı, partiyon içinde akışkanlaşan tozların kaplama sıvısı ile kaplanıp partiyondan ayrılan partiküllerin genişleyen yatağa geçmesi, hızının düşmesi ve alttan gelen havanın ventüri etkisiyle tekrar partiyon içine girerek sirküle etmesi şeklindedir. Optimum konfigürasyon ve seri yüklemesinde partikülün bir devri 6-10 saniyedir. Partiyon olmadan da aynı akış kalıbı sağlanabilmektedir. Partiyon çıkarılarak da işlem yapılabilir. Hava dağıtım plağındaki farklı büyüklükteki deliklerle basınç farkı yaratılarak partiyon etkisi elde edilmektedir (Pusapati ve Rao, 2014).

Yandan Püskürtmeli Akışkan Yatak

Altan püskürtmeli akışkan yatağa benzer, fakat ürün hareketi rotor disk üzerindedir. Akış kalıbı farklılık göstermektedir. Bu sistemde rotor çevresinden giren hava ile yukarıya doğru akışkanlaşma, santrifüj etkisi ile çepere yaklaşma ve yerçekimi etkisi ile düşme hareketlerinin bir bileşimi olarak partiküller helezon - spiral şeklinde bir akış göstermektedir. Diğer tiplere göre fazla miktarda toz, kurutma ve fiziksel hareketten dolayı uniform boyutta, yoğun ve düzgün yüzeyli aglomeratlar oluşturabilir. (Pusapati ve Rao, 2014). Bu nedenle daha çok pelletlerin kendisinin elde edilmesi için kullanılır.

Akışkan yatak sistemlerinden elde edilen ürünlerin kalitesini etkileyen ve ürün bazında değerlendirilmesi ve optimize edilmesi gereken parametreler Çizelge 1.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.8. Akışkan yatak sistemlerinde işlem parametreleri.

Cihaz Parametreleri	Formülasyon Parametreleri	Proses Parametreleri
Partisyon yüksekliği	Toz partikül büyüklüğü ve dağılımı	Seri büyüklüğü
Giriş hava dağıtım plağı	Toz materyal	Ürün sıcaklığı
Püskürtme başlığı konfigürasyonu	Bağlayıcı/kaplama materyali	Akışkanlaştırıcı havanın hızı/sıcaklığı/nemi/miktarı
	Bağlayıcı/Kaplama konsantrasyonu	Sprey hızı
	Bağlayıcı çözücüsü	Sprey nozzle çapı/basıncı
	Bağlayıcı yardımcı maddeleri	Sıvı damlacık büyüklüğü

1.3.3.3 Akışkan Yatak ile Partiküler Sistemlerde Yapılan Çalışmalar

Akışkan yatakta kaplama, otomasyona uygunluğu, ölçek büyütmeye olanak vermesi nedeniyle konvansiyonel dozaj formlarının kaplanmasında endüstride oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Bunun yanında büyük serilerin granülasyon işleminde de kullanıldığından farmasötik endüstride en çok bilinen ve kullanılan cihazlardandır.

Akışkan yatak cihazında modern dozaj şekillerinden üzerinde en çok bilimsel çalışma yapılan ve piyasada da mevcut olan sistemler mikropartiküllü sistemlerdir. Bu sistemler genellikle inert selüloz veya şeker pelletler üzerine etkin maddelerin kaplanması ile oluşturulmaktadır. Bu sistemler konvansiyonel dozaj şekillerine göre yüksek biyoyararlanım, düşük lokal irritasyon, düşük sistemik yan etki, çoklu doza imkan sağlama, kolona kolayca ulaşabilme, kolonda daha uzun kalma, boyutları nedeniyle gastrointestinal kanaldan daha kolay geçebilme, gastrointestinal kanalda tek düze dağılım verebilmeleri gibi özellikleri nedeniyle daha avantajlıdır. Ayrıca polimerlerle kaplama ile etkin madde salımı kontrol edilebilmekte ve sıfır derece salıma ulaşılabilir (You ve ark., 2014; Terebesi ve Bodmeier, 2010; Yamada ve ark., 2014).

Son yıllarda nanosistemlerin önem kazanmasıyla polimer, lipid, sürfaktan gibi farklı materyaller kullanılarak değişik nanopartikül tipleri üretilmektedir. Nanopartiküller, boyutlarının küçük olması dolayısıyla oldukça geniş yüzeye sahip olmaları nedeniyle, konvansiyonel ilaçlara göre daha etkili olduğu düşünülmektedir. Fakat nanopartiküller yüksek yüzey alanı ve yüksek yüzey enerjisi nedeniyle agregasyona meyillidir. Agregasyon çeşitli stabilizörlerle engellenmeye çalışılsa dahi uzun süreli saklamada kristal büyümesi (Ostwald ripening) etkisiyle agregasyon gerçekleşmektedir (Bhakay ve ark., 2018). Bunu engellemek ve stabiliteyi artırmak için nanopartiküller, nanokompozit mikropartiküller haline dönüştürülerek yapıları korunabilmektedir..

Bunların yanısıra özellikle lipid ve veziküler nanopartikül sistemlerinin ürün haline dönüştürülüp piyasaya çıkabilmesi için katı dozaj formu haline getirilmeleri tercih edilmektedir. Bu formlarının katı dozaj şekli haline getirilmelerinde püskürterek kurutma, proveziküler sistemler gibi farklı yaklaşımlar olsa da son yıllarda akışkan yatak cihazında bu sistemlerin katı hale getirilmesi yenilikçi bir yaklaşımdır.

Tian ve ark.ının (2013) yaptıkları çalışmada, etkin maddesi fenofibrat olan ve Precirol ATO5, Captex100 ve Tween 80 kullanarak eritme-emülsifikasyon yöntemiyle nanoyapılı lipid taşıyıcılar (NLC) üretilmiştir. Bu NLC süspansiyonu, film oluşturan polivinil prolidon K17 çözeltisinde disperse edilerek akışkan yatak cihazında inert pelletler üzerine püskürtülmüş, pelletlerin kaplanması sağlanmıştır. Üretilen NLC kaplı pelletler ilk 15 dakika içinde NLC'lerin % 90'ını salmış, yapılan rekonstitüsyon çalışmasında da orijinal NLC ile aynı küresel morfolojiyi göstermesine rağmen partikül boyutu 94,1 nm'den 227,5 nm'e çıkmıştır. Fakat NLC kaplı pelletlerle orijinal NLC süspansiyonunun benzer lipoliz profili ve farmakokinetik parametrelere sahip olduğu bulunmuştur(Tian ve ark., 2013). Nanoboyutta lipozom üretiminde genel olarak sonikasyon kullanılmaktadır. Fakat sonikasyon, büyük ölçekte üretime izin vermemektedir. Büyük ölçekli üretim için çözücü enjeksiyon temelli süperkritik ters faz evaporasyonu gibi yöntemler kullanılmakta, bu yöntemlerin de yüksek maliyet, düşük verim gibi problemleri bulunmaktadır. Proveziküler sistemler bu sistemlerin büyük ölçekte üretilmesini sağlayan ve lipozom / niozomun stabilitesini koruyan

alternatiflerdir. Fosfolipitlerin / yüzey aktif maddelerin suda çözünebilir bir katı taşıyıcıya yüklenmesi sonucu elde edilen proveziküler sistemler, kullanılacağı zamanda suyla hidrate edilerek partiküllerin oluşturulması esasına dayanmaktadır (Bayındır ve Yüksel, 2015). Gala ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada, hidrojenlenmiş fosfatidilkolin ve etkin madde beklametazon dipropiyonat,akışkan yatak cihazında sükröz yüzeyine kaplanmıştır. Hidratasyonun ardından oluşan lipozomlarda yüksek basınçlı homojenizasyon ve prob sonikasyon ile boyut küçültülmüş ve dondurarak kurutularak stabil lipozomlar elde edilmiştir. Bu çalışmada sükröz hem prolipozom taşıyıcısı hem de kriyoprotektan olarak görev yapmıştır.

Lei ve ark. (2011) tarafından yürütülen çalışmada, siklosporin A'nın çözünürlüğünü arttırmak amacıyla üçgen faz diyagramı yardımıyla kendiliğinden oluşan nanoemülsiyonlar oluşturulmuştur. Yağ olarak Labrafil M 1944 CS ve etil oleat; sürfaktan olarak Cremophor EL ve RH40; kosürfaktan olarak da Transcutol P ve 1,2-propilen glikol kullanılmıştır. Çeşitli kompozisyonlarda yağ ve sürfaktan / kosürfaktan oranları değiştirilerek optik özelliklerine göre emülsiyonlar belirlenmiş, daha sonra belirlenen emülsiyonlara siklosporin eklenerek nanoemülsiyonlar oluşturulmuştur. Oluşan nanoemülsiyonlar PVP K30 içerisinde disperse edildikten sonra akışkan yatak cihazında inert şeker pelletler üzerine kaplanmıştır. Elde edilen pelletlerden çıkış hızı, nanoemülsiyon süspansiyonuna göre düşük olsa da rekonstitüsyon çalışmaları sonucuna göre partikül boyutları arasında anlamlı değişim olmamıştır ($21,2 \pm 2,6$ nm - $23,7 \pm 2,9$ nm)(Lei ve ark., 2011).

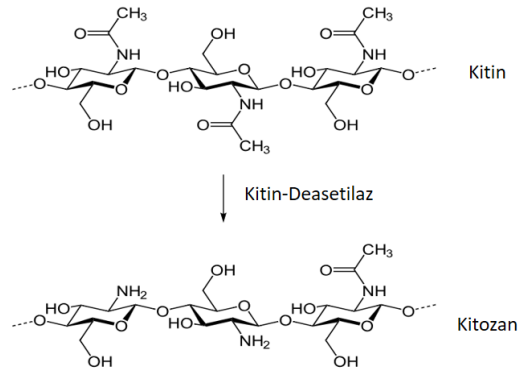
Bunların yanısıra nanopartiküllerden granül elde edilerek nanokompozit mikropartiküllerin elde edilmesiyle de stabil nanopartiküller elde edilebilmektedir (de Andrade ve ark., 2018).

1.4.Çalışmada Kullanılan Polimerler

Bu tez çalışmasında nanopartiküllerin hazırlanmasında kolona hedefleme amacıyla prebiyotik etkili ve kolon-spesifik degrade olan inülin ve pektin ile biyoadeziv etkili ve kolonda sıkı birleşim yerlerini (tight junction) açarak permeabiliteyi artıran kitozan nanopartiküllerinin hazırlanması; bu nanopartiküllerden SAME'nin üst GI sistemde salımını önlemek için enterik polimerlerle kaplanması amaçlanmıştır. Prebiyotikler, GI sistem üst kısmında hidrolize edilmeyen ve absorbe edilmeyen, ancak kolonik mikroflorada çok sayıda yararlı bakterilerden bir veya daha fazlası için seçici substrat olan maddelerdir. Bu nedenle kolonik mikrofloranın sağlıklı bileşimine katkıda bulunarak, insanlarda genel sağlık için yararlı luminal veya sistemik etkileri indükleyen maddelerdir (Gibson ve Roberfroid ,1995). Dolayısıyla SAME içerecek prebiyotik maddelerin, ESS sistemi ile de ilişkili olarak depresyona karşı etkinliğin artması söz konusu olacaktır.

1.4.1.Kitozan

Kitozan üzerinde yıllardır geniş araştırmaların yapıldığı, yapısı ve terapötik etkileri tanımlanan, vücutta absorbe edilebilen ve güvenilir olarak tanımlanan (GRAS) önemli bir polimerdir. Kitozan, D-glukozamin ile N-asetil-D-glukozaminin 1→4 bağlanmasıyla oluşan düz zincirli bir aminopolisakkarittir. Midye ve ıstakoz kabuklarından elde edilen kitinin deasetilasyonu ile elde edilir (Şekil 1.14). Asidik ortamlarda çözünür. Kitinin %75'ten fazla deasetilasyon derecesine sahip olan formuna kitozan adı verilmektedir. Kitozanın vizkozite, çözünürlük, reaktivite, şelasyon gibi fizikokimyasal özellikleri, deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığıyla değişmektedir.



Şekil 1.14. Kitin deasetilasyonu.

Deasetilasyon derecesi kitozan çözeltilerinin yüzey gerilimi, viskozite ve iletkenliğini; nanopartikül formüllerinde partikül boyutunu, yüklenme etkinliğini ve bazı biyolojik aktiviteleri (pre-osteoblast hücre kültüründeki aktivite) etkilemektedir (Yang ve Hon, 2010; Yuan ve ark., 2011; Zhuang ve ark., 2019).

Deasetilasyon dışındaki etkili parametre olan molekül ağırlığı da kitozanın özelliklerini ve bundan dolayı kullanım amacını etkileyen önemli bir özelliktir. Chen ve ark. (1996) aynı asetilasyon derecesine sahip (%90) farklı molekül ağırlıklı kitozan filmlerin etkisini incelemek üzerine yapmış oldukları çalışmada molekül ağırlığının gerilme kuvveti, gerilim uzaması (tensile elongation) ve entalpinin molekül ağırlığıyla doğru orantılı, permeabiliteyle ters orantılı olduğu bulmuşlardır. Yang ve Hon'un (2009) molekül ağırlığının kitozan nanopartiküllerine etkisini inceledikleri çalışmada molekül ağırlığı partikül boyutlarını doğru orantılı etkilerken, yükleme etkinliğine ters oranda etki etmiştir.

Kitozan yapısındaki amin grupları nedeniyle katyonik özellik göstermektedir. Vücutta membranların yüzeyi ve kaplı olduğu mukus tabakası negatif yüklüdür. Bu sebeple katyonik özellikteki kitozan, bu negatif membranlarla etkileşmektedir (mukoadezyon). Kitozanın mukoadezyon etkisi kullanılarak biyoyararlanımı artırma çalışmaları yürütülmüş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Ways ve ark., 2018). Kitozan, katyonik özelliğinden antimikrobiyal etki de göstermektedir. Kitozanın antimikrobiyal etkisi kitozanın çözünürlüğü arttıkça artmaktadır (Du ve ark., 2009; Kahya, 2018). Kitozan, katyonik özelliğinden dolayı hücre membranlarıyla etkileşerek

tight junction denilen sıkı bağlantı noktalarını açar ve epitel dokulardan etkin maddenin geçişini artırarak biyoyararlanımın artmasına neden olur (Saremi ve ark., 2011).

Kitozan yapısındaki reaktif fonksiyonel gruplardan dolayı da birçok kimyasal modifikasyona olanak sağlamaktadır. Kitozan kendi başına kullanılabildiği gibi isteğe bağlı etkiler doğrultusunda yapısında değişiklik yapılarak da kullanabilmektedir. Örneğin N,N,n-trimetil kitozan, tiyollenmiş kitozan, kitozan klorür, kitozan glikol ve kitozan-siklodekstrin inklüzyon bileşiği gibi.

Kitozan yukarıda sayılan özelliklerinin yanında bazı terapötik özellikler de göstermektedir:

- Yara iyileştirici özelliğe sahiptir: (Dai ve ark., 2011).
- Kitozanın antihiperkolesterolemi etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. (Jaffer ve Sampalis, 2007; Tao ve ark., 2011).
- Kitozanın kan basıncını düzenlediğine dair klinik çalışmalar mevcuttur. (Huang ve ark., 2018).
- Ağrı kesici ve antienflamatuvar etkiye sahiptir. (Baltaru ve ark., 2013).

1.4.1.1.Kitozan nanopartikül üretim yöntemleri

Kitozan nanopartiküllerinin üretiminde kitozanın özelliklerinden yararlanılarak çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en çok kullanılanları aşağıda açıklanmıştır.

İyonotropik jelasyon: Kitozanın taşıdığı amin gruplarından dolayı katyonik özelliğe sahiptir ve bu özelliğinden dolayı iyonotropik jelasyon en çok kullanılan yöntemdir. Anyonik etkili bir madde ile iyonik kompleks oluşturarak kitozan nanopartiküllerinin oluşması sağlanmaktadır. En çok kullanılan anyonik ajan tripolifosfattır (Bilensoy ve ark., 2009; Tilkan ve Özdemir, 2018).

Bazı kaynaklarda polielektrostatik kompleks yöntemi adı verilen yöntemde kitozan, polianyonlarla (pektin, jelatin gibi) etkileşime girerek nanopartiküller oluşturulmaktadır (Alkhader ve ark., 2017; Yoncheva ve ark., 2019)

Emülsiyon çözücü difüzyon tekniği: Bu yöntemde hidrofobik etkin maddeyi içeren organik faz, kitozan ve stabilizör içeren su fazına ilave edilip s/y veya s/y/s tipi emülsiyon hazırlanır ve ardından organik fazın uçurulması sonucu kolloidal dispersiyon elde edilir. Bu dispersiyon sudan santrifüjle ayrılarak nanopartiküller elde edilir. Özellikle suda çözünür etkin maddelerin, peptit-proteinlerin enkapsülasyonunda oldukça sık kullanılmaktadır (Karnchanajindanun ve ark., 2010; Prado ve ark., 2017). S/y tipinde üretilen nano/mikroemülsiyonlar daha sonra bir çapraz bağlayıcı yardımıyla sertleşmesi sağlanıp daha stabil nanopartiküller de elde edilebilmektedir (Karnchanajindanun ve ark., 2010). Kitozan nanopartiküllerinde genel olarak gluteraldehit, genipin, epiklorohidrin, sitrik asit, tartarik asit, malik asit ve vanilin çapraz bağlayıcıları kullanılmaktadır (Bodnar ve ark., 2005; Coelho ve ark., 2007; Gupta ve Jabrail, 2007; Karnchanajindanun ve ark., 2010; Peng ve ark., 2010)

Desolvasyon yöntemi: Bu yöntemle kitozan sulu çözeltisi organik solvan içeren faza damla damla damlatılarak partiküllerin oluşturulması sağlanmaktadır. Çözeltide türbidite meydana geldikten sonra çapraz bağlayıcılarla nanopartiküller sertleştirilmektedir. Bunların yanında desolvasyon çeşitli tuzlarla da oluşturulmaktadır. Suyu ilgisi yüksek bir tuz kitozan çözeltisine ilave edildiği zaman polimerin çözünürlüğü düşmekte ve kolloidal partiküller oluşmaktadır (Mao ve ark., 2001).

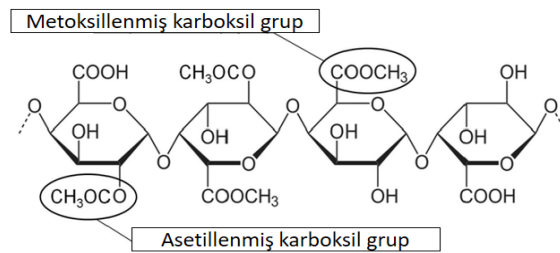
Ters misel yöntemi: Normal miseller kritik misel konsantrasyonuna ulaştıktan sonra hidrofik uçları dışarda hidrofob uçları içeride olacak şekilde meydana gelen yapılardır. Lipofilik sürfaktanlar organik solvanda aynı şekilde davranarak dışta hidrofob içte hidrofilik uçlar kalacak şekilde dizilerek ters miselleri oluştururlar. Bu özellikten yararlanılarak s/y tipi emülsiyonlar oluşturularak kitozan nanopartikülleri hazırlanır. Genellikle sodyum bis(etil hekzil) sülfasüksinat (AOT) ve setil trimetilamonyum bromür (CTAB) kullanılır. Su fazına eklenen çapraz bağlayıcılarla (gluteraldehit,

CaCl₂) bu sistemin stabil olması sağlanır (Kafshgari ve ark., 2012; Orellano ve ark., 2017; Sailaja ve Amareshwar, 2011).

1.4.2.Pektin

Pektin , Yunanca πηκτικός pēktikós kelimesinden türetilmiş koyu kıvamlı, ağır anlamına gelmekte olup, selüloz, hemiselülozla birlikte bitkilerin hücre duvarlarında destek doku işlevi gören bir polisakkarittir (Liddell ve Scott, 2019). Ayrıca hücre sitoplazmasında çözünmüş olarak birçok meyve ve sebzede bulunmaktadır. Son yıllarda jel oluşturabilme, emülsifiyan ve stabilizan etkileri nedeniyle gıda endüstrisinin yanında ; biyouyumlu, non-toksik ve biyoparçalanabilir özelliklerinden dolayı ilaç ve protein taşıyıcı sistem olarak da kullanımı artmaktadır. Molekülün modifikasyona açık ve esnek olması farklı klinik kullanımlara olanak sağlamaktadır. Özellikle degradasyonu kolondaki bakteriler tarafından üretilen pektinaz enzimiyle gerçekleştiğinden kolona hedeflendirme sistemlerinde kullanılan en önemli polimerlerdendir.

Bunun yanısıra adezifliği artırmaya yönelik çeşitli modifikasyonlar ile nazal ve mukozal ilaç taşıyıcı sistemlerinde de oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (Charlton ve ark., 2007; Liu ve ark., 2006).



Şekil.1.15. Pektinin kimyasal yapısı.

Pektin, serbest halde ve esterlenmiş haldeki karboksilik asit grupları taşıyan poligalakturonik asit zincirlerinden oluşur (Şekil 1.15). Üzerindeki karboksilik asit grupları nedeniyle anyoniktir. Esterleşme derecesi; bitki kaynağından, nerede- ne zaman toplandığından, proses şartlarına (izolasyon, ekstraksiyon, saflaştırma) göre

değişmektedir ve bu farklılık pektinin çözünürlük, jelleşme ve film oluşturabilme özelliklerini değiştirmektedir. Esterleşmiş galakturonik asit/ toplam galakturonik asit, esterleşme derecesini verir ve bu esterleşme miktarının %50'den büyük ya da küçük olmasına göre düşük ya da yüksek esterleşme dereceli pektin olarak adlandırılır. Düşük esterleşme dereceli pektin yüksek esterleşme dereceli pektinin demetilasyonu ile elde edilir. Bunun yanında düşük esterleşme dereceli pektinin başka bir alt tipi de amidasyona uğramış pektindir. Karboksilik asitin amonyum ile muamelesi sonucu amid oluşumuyla gerçekleşir. Amide edilmiş galakturonik asidin toplam galakturonik aside oranı amidasyon derecesini verir. Resmi düzenlemelere göre pektindeki amit oranının % 25 olmasına izin verilmektedir. Esterleşme derecesi pektinin özelliklerini etkileyen en önemli parametredir. Piyasadaki HM pektinler % 60-75 ; LM pektinler ise % 20-40 esterleşme derecesine sahiptir (Aslan, 1994; International Pectin Producer Association , 2019) .

1.4.2.1.Pektin nanopartikülleri üretim yöntemleri

Pektin, süspansiyon, emülsiyon, tablet gibi konvansiyonel dozaj şekillerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik olarak uyumlu ve güvenilir bir polimer olduğundan başta oral olmak üzere nazal, vajinal, bukkal, topikal uygulamaları mevcuttur. Bunların yanında son yıllarda farmasötik nanoteknolojide kullanımı giderek artmaktadır. Pektin nanopartiküllerinin üretim yöntemleri aşağıda verilmektedir. .

İyonotropik jelasyon: Pektin, taşıdığı karboksil gruplarının iyonlaşması ile negatif yüklenir. Böylelikle pozitif yüklü gruplarla iyonik kompleks oluşturarak kompleksler halinde çökmektedir. Pektin hakkındaki çalışmaların büyük çoğunluğunda kullanılan yöntem iyonik jelasyon yöntemidir. Pektin, anyonik bir polisakkarit olduğundan dolayı genellikle divalen katyonlarla kompleksleşerek partiküler yapı oluşturmaktadır. Divalen katyon olarak başta kalsiyum klorür olmak üzere çinko klorür ve magnezyum klorür kompleksleştirici ajan olarak kullanılır (Jonassen ve ark., 2013; Opanasopit ve ark., 2008)

Koaservasyon: Koaservasyon; sıcaklık değişimi, pH, tuz, iyonlar , non-solvan veya geçimli olmayan polimer eklenmesi ile pektinin çözünürlüğünün düşürülerek kolloidal partiküllerin çözeltiden ayrılıp floküle agregatlar oluşturması şeklinde gerçekleşmektedir. Basit koaservasyon tuz, ko-solvan, pH gibi parametrelerde değişiklik yapılmasıyla; kompleks koaservasyon ise genellikle zıt yüklü başka bir polimerin ilavesiyle çözünürlüğün düşürülüp kompleksleşme ile karakterize edilir.

Pektin molekülünün suda çözünürlüğü pH'ya bağımlılık gösterir ve pH'nın değiştirilmesiyle çözünürlüğü azaltılarak agregatlar oluşturur. Özellikle HM pektinlerin jelleşme mekanizması, çözünen madde varlığı ve asit ortamda gerçekleşir. Nakagawa ve ark.nın (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, pozitif yüklü kazein ile (HM) pektin çözeltisi inkübasyona bırakılmış ve pH 4 - 7 arasında agregat oluşturarak nanopartikül oluşumu sağlanmıştır. Türbidite çalışmalarına göre çözelti berraklığı, pH 5'ten sonra sağlanmış ve pH 5'in altında presipitasyon gözlenmiştir. En net faz ayrımı pH 4.0'de gözlenmiştir. pH 7.0'den pH 5.2'ye geçerken partikül büyüklüğü 30 nm'den 98 nm'ye kadar değişmekte; pH 5.3'te keskin bir artışla 270 nm'ye çıkmaktadır (Nakagawa ve Kagemoto, 2013).

HM pektin ve B-laktoglobulin kullanarak iki farklı şekilde nanopartikül üretilmiştir. Tip 1 metotta B-laktoglobulin nanopartikülleri üretilip , basit bir karıştırmayla uygun pH'da ($pH < 6$) pektin ile kaplanmıştır; Tip 2 metotta termal denatürasyon sıcaklığının üstüne çıkılarak denatüre edilen B-laktoglobulin proteini ile pektinin kompleksleştirilmesi ve daha sonra sıcaklığın düşürülmesiyle nanopartiküller elde edilmiştir. Zeta potansiyelleri genel olarak aynı olmasına rağmen Tip 1 nanopartiküllerin ($d= 430$ nm) Tip 2 nanopartiküllere ($d= 300$ nm) göre daha büyük olduğu gözlenmiştir (Jones ve ark., 2010).

Emülsiyon oluşturma - çözücü buharlaştırma: Bu yöntemde y/s veya s/y/s tipi nanoemülsiyonlar hazırlanarak oda sıcaklığında, sıcaklık veya vakum altında

bekletilerek organik solvan uzaklaştırılmasıyla nanopartiküller elde edilmektedir. Polisakkaritler genellikle suda çözündüğünden hazırlanan sulu çözeltileri su ile karışmayan organik fazlara ilave edilerek, ultrasonla ya da homojenizasyon ile y/s veya s/y tipi emülsiyonlar elde edilmektedir. Bu emülsiyondan organik faz çözücülerinin buharlaştırılmasıyla katı kolloidal partiküller şeklinde nanopartikülleri içeren bir dispersiyon oluşmaktadır.

Burapadhy ve ark. (2012), suda çözünürlüğü düşük olan itrakonazolü emülsiyon buharlaştırma yöntemini kullanarak pektin bazlı nanopartiküllere yüklemişlerdir. LM, HM ve amide edilmiş LM pektinlerin sulu çözeltisi, emülgatör ve etkin maddenin kloroformdaki çözeltisi ile karıştırılarak yüksek basınçlı homojenizatör yardımıyla y/s tipi nanoemülsiyon üretilmiştir. Daha sonra kloroformun uçurulmasıyla itrakonazol yüklü nanopartiküller elde edilmiştir. HM pektin nanopartikülleri 700 nm, LM pektin boyutu ise 100-220 nm arasında değişmektedir. Yükleme etkinlikleri ise % 59.69 - 82.01 arasında değişmektedir. In vivo – in vitro çalışmalar sonucunda HM pektinler daha stabil, biyoyararlanımı ve çözünme profilleri daha yüksek olarak bulunmuştur.

Kimyasal sentez: Thakur ve ark. (2014), polianilin ve pektin konjugasyonu ile ürettiği nanopartikülleri fonksiyonelize ederek amperometrik glukoz biyosensörü oluşturmuştur. Pektin ve polianilin çözeltisinde kimyasal yollarla nanopartiküller sentezlenmiş, hidroalkolik (1:1) antisolvan ilavesiyle dispersiyonun presipitasyonu sağlanmıştır. Daha sonra bu nanopartikül dispersiyonuna kimyasal konjugasyon ile glukoz oksidaz bağlanarak fonksiyonellik kazanmıştır. Glukoz oksidaz bağlı nanopartikül boyutu 237 ± 6 nm bulunmuş, pektin bu formülasyonda stabilizer ve ligandın bağlayıcı görevini üstlenmiştir. Ayrıca sensör hassasiyetini pektinsiz nanopartiküllere göre 3 kat artırmıştır.

Mikroakışkanlaştırma yöntemi: Süspansiyonların homojenizasyonunda kullanılan bir yöntemdir. Yüksek basınç altında (-4000 bar) 2 akımın yüksek hızlarda çarpışmasıyla homojenizasyon gerçekleşir. Bu esnada ortamdaki türbülans akış, gerilme kuvveti ve

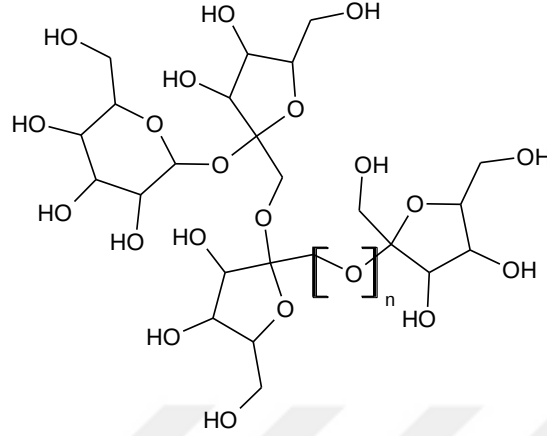
partiküllerin çarpışması partikülleri nanoboyutuna getirir. Pektin boncuklarla yapılan çeşitli çalışmalar mevcut olsa da nanopartikül üretiminde de kullanılmaktadır. Tang ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada adriamisinle pektinin konjugatını (PAC % 25.8 ADM), PVP K30 ve gliserolle karıştırarak oluşturdukları süspansiyonu 120 mPa basınç altında mikroakışkanlaştırıcıdan geçirerek yaklaşık 152 nm büyüklüğünde nanopartiküller oluşturmuşlardır. Ogończyk ve ark. (2011), hazırladıkları altın ve gümüş nanopartikülleri mikroakışkanlaştırma cihazı ile pektin boncuklarına hapsetmişlerdir. Nanopartikül süspansiyonu pektinle karıştırılmış, eksternal divalan katyon kaynağı olarak CaCO_3 kullanılmış ve çeşitli hızlarda farklı nanokompozit pektin boncukları oluşturmuşlardır. Emülsifikasyon yöntemine göre daha monodispers partiküller elde etmişlerdir(Ogonczyk ve ark., 2011).

Ogończyk ve ark. (2011), hazırladıkları altın ve gümüş nanopartikülleri mikroakışkanlaştırma cihazı ile pektin boncuklarına hapsetmişlerdir. Nanopartikül süspansiyonu pektinle karıştırılmış, eksternal divalan katyon kaynağı olarak CaCO_3 kullanılmış ve çeşitli hızlarda farklı nanokompozit pektin boncukları oluşturmuşlardır. Emülsifikasyon yöntemine göre daha monodispers partiküller elde etmişlerdir.

1.4.3. İnülin

İnülin, *Cichorium intybus* (Karahindiba), *Dahlia pinnata* CaV. (Yıldız çiçeği) bitkilerinden elde edilen; fruktoz ünitelerinin β (2→1) bağlanmasıyla oluşan ve bir glikozla sonlanan polisakkarittir (Şekil 1.16). Yapısındaki β (2→1) bağımlı sindirecek enzim insanlarda bulunmamakta, insan kolonunda bulunan bifidobakteri ve laktobasil bakterilerindeki inülinaz tarafından sindirilebilmektedir. Sindirim sonucu oluşan bütirik asit ve propiyonik asit gibi kısa zincirli yağ asitleri sayesinde kolon ortamında sağlıklı bir ortam oluşmakta, kolon kanseri oluşumu engellenmektedir. İnülinin insülin sekresyonu ve açlık baskılayıcı etkisi olan GLP-1 hormonunu indüklediği bilinmektedir ve bu sayede insülin sekresyonunu arttırmakta, beyindeki açlık baskılama bölgesini indüklemektedir. Bu özellikleri nedeniyle gıda endüstrisinde, diyet ürünlerinde sıkça kullanılmaktadır. Bunların yanında inülinin antikanser etkisi,

immün yanıtı arttırdığı için aşılarda adjuvan olarak kullanımı, peptit-proteinlerde stabilizör, immünomodulator ve böbrek fonksiyonlarının teşhisi gibi kullanım alanları mevcuttur (Barclay ve ark., 2010; Mensink ve ark., 2015).



Şekil 1.16. İnülin kimyasal formülü

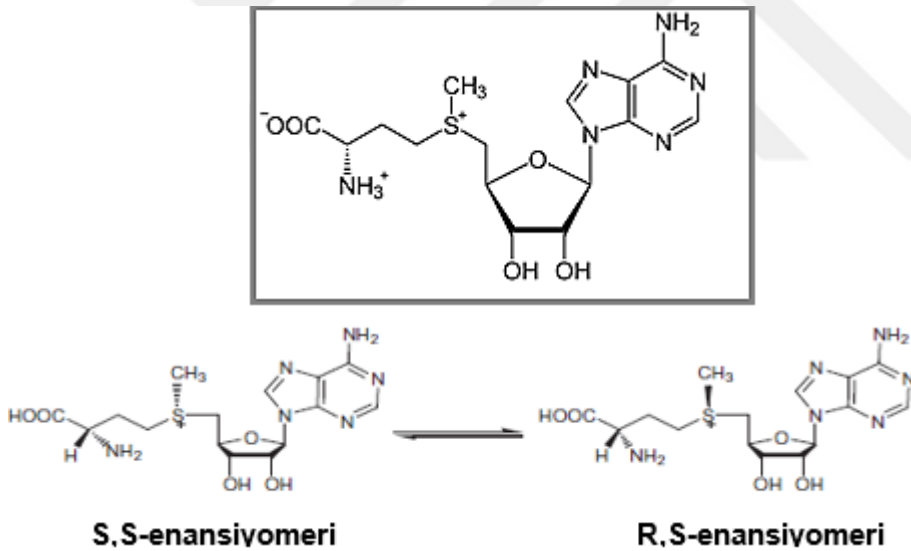
Kolon sağlığının başta mental rahatsızlıklar olmak üzere romatizma, obezite, diyabet, böbrek, otizm gibi bir çok hastalıkta etkisi olduğu ve probiyotiklerin hedeflendirilmesinin zorluğu gözönüne alındığında prebiyotik etkili inülin kolonik mikrobiyota düzenlenmesi açısından çok önemlidir. İnülinin hidrojel ve mikroküre formülasyonları hazırlanarak kolona spesifik ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımı üzerinde pekçok çalışma mevcuttur (Akhgari ve ark., 2006; Jain ve ark., 2014; Lopez-Molina ve ark., 2015; Van Den Mooter ve ark., 1997). İnülin ile yapılan partiküler çalışmalar genel olarak çok hidrofilik olduğundan hidrofoblaştırıldıktan sonra gerçekleştirilmektedir.

1.5. S-Adenozil-L-Metiyonin

İlk olarak 1952 yılında C.L. Cantoni tarafından keşfedilen SAdMe, esansiyel aminoasit metiyonin ve adenzin trifosfattan oluşmaktadır. SAdMe tüm canlı hücrelerinde doğal olarak bulunan, metiyonin aminoasitinin metiyonin adenoziltransferaz enzimi ile ATP'ye bağlanmasıyla oluşan bir kofaktördür. IUPAC okunuşu:

(2S)-2-amino-4-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(6-aminopurin-9-il)-3,4-dihidroksoksolan -2-il] metil-metilsulfonio] butanoat olan madde S-Adenosyl-L-methionine; SAM-e; SAdMe, AdoMet, ademetyonin adıyla da bilinmektedir (şekil 1.17). Bu molekül kanda doğal olarak bulunan L-metiyoninin direk metabolitidir.

Kapalı formülü $C_{15}H_{22}N_6O_5S$ olan SAdMe'nin molekül ağırlığı 399.45 g/mol'dür, aktif ve inaktif formlarda enantiyomerleri (S,S-aktif; S,R-inaktif) bulunmaktadır ve yarılanma ömrü 100 dk'dır. Diğer fizikokimyasal özellikleri izelge 1.9'de belirtilmiştir.



şekil 1.17. SAdMe'nin ve diastereoizomerlerinin kimyasal formülü.

Çizelge 1.9. SAME'ye ait fizikokimyasal özellikler ((The Toxin And Toxin Target Database), 2019)

Kapalı Formül	C ₁₅ H ₂₃ N ₆ O ₅ S
Suda çözünürlük	1.19 mg/ml
Log P	-2 ve -5.3
pKa (En kuvvetli asit)	1.71
pKa (En kuvvetli baz)	9.41
Fizyolojik net yük	+1
Refraktivite	96.23 m ³ ·mol ⁻¹
Yarılanma Ömrü	100 dk

SAME yaşayan her canlı hücrede bulunmakta ve metiltransferaz enzimleri ile katalize edilen 100 üzerinde farklı reaksiyonda metil gruplarının donörü (trans-metilasyon) olarak fonksiyon görmektedir. SAME poliaminlerin sentezini yönlendiren trans-aminopropilasyon yolağında ve glutatyon sentezini yönlendiren trans-sülfürasyon yolağında bir prekürsör molekül olarak da rol oynamaktadır (Şekil 1.18).

1.5.1.SAME'nin Moleküler Düzeyde Fonksiyonları

1-Trans-metilasyon: SAME hücrel metilasyon reaksiyonlarında tek başına metil donörü olarak işlev görür. Buna bağlı olarak vücutta rol aldığı önemli olaylar şunlardır:

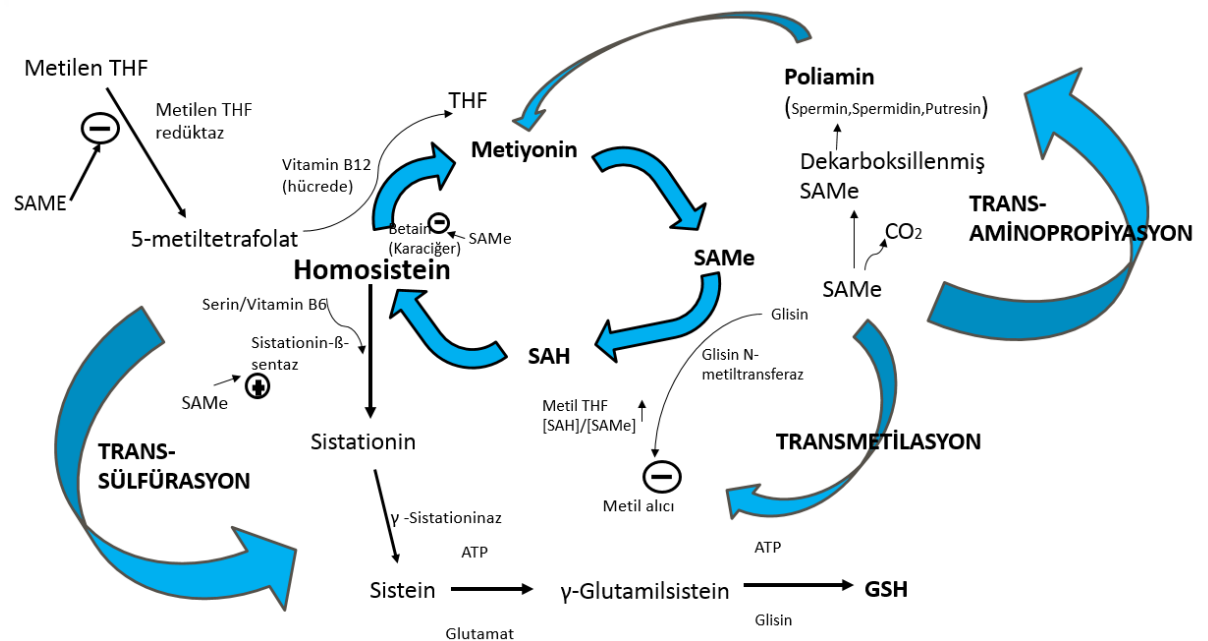
Kalıtım: Hastalıkların oluşmasında epigenetiksel değişimler söz konusudur. Bu değişimlerin en önemlisi de DNA metilasyonudur. Ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde DNA sitozin kalıntılarının C-5 pozisyonunda enzimatik metilasyonla oluşan 5-metilsitozin, belirli gen gruplarının baskılanması, transkripsiyon inhibisyonu ve hücrel farklılaşmalara neden olmaktadır (Chiang, 1996). DNA hipometilasyonu, kromozomal instabiliteye yol açabilmekte ve mutasyonlara neden olabilmektedir. Hastalık ve DNA metilasyonundaki değişiklikler arasındaki en iyi bilinen ilişkiler, kanser için tanımlanmıştır ve kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha hipometile olduğu gösterilmiştir. Metilasyon kaybının özellikle kanserde tümör süpresyonunu, hastalığın ciddiyetini ve metastazı etkilediği gösterilmiştir (Bora, 2007; Bottiglieri, 2002).

DNA hipometilasyonu onkogen transkripsiyonunu aktive ederek kanserin oluşmasını ve tümör hücrelerinin gelişmesini sağlar. Genel metil donörü SAME tedavisiyle kanser hücrelerinde DNA metilasyonu sağlanarak kanser hücrelerinde genlerin susturulması üzerine çeşitli çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada SAME gastrik ve kolonik kanser hücrelerin üzerine uygulanarak C-myc ve H-ras onkogen genleri ile tümör supresör gen olan p16 (I NK4a) genlerine olan etkileri incelenmiştir. Tedavi sonucu kanser hücrelerindeki büyümenin inhibisyonu normal hücrelere göre belirgin şekilde sağlanmıştır. Normal şartlarda C-myc ve H-ras onkogen genleri hipometiledir. SAME tedavisiyle bu genlerdeki mRNA ve protein ekspresyonu önemli ölçüde azaltılmıştır. Fakat tümör süpresör geni üzerinde etkili bulunamamıştır (Luo ve ark., 2010). Meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda da SAME'nin metastazı yavaşlattığı ve hücre proliferasyonunu durdurduğu gösterilmiştir (Delle ve ark., 2017; Mahmood ve ark., 2018).

Hücrel Transdüksiyon: Metilasyon hücrel membranların bütünlüğü açısından da son derece önemlidir. SAME'nin, fosfatidiletanolamine üç metil grubu vermesiyle fosfatidilkolin oluşmaktadır. Fosfatidil kolin, ökaryotik hücrelerin biyolojik membranların ana bileşenlerinden birisidir ve membranların oluşturulmasında yapısal işlevi olan bir molekül olması yanısıra hücre zarında sinyal transdüksiyonunda da rol oynamaktadır. SAME sayesinde gerçekleşen fosfolipit metilasyonu, membran viskozitesinde azalma sağlamakta; böylece proteinlerin ve reseptörlerin hareketini kolaylaştıran bir ortam sağlanmaktadır (Munzel, 1982).

Nörotransmitter: SAME monoamin nörotransmitterlerin -serotonin, melatonin, epinefrin, dopamin- sentezinde de etkilidir. Ayrıca SAME tarafından metil grubunun verilmesi dopamin nöronlarını da korumaktadır. Özellikle sinirler üzerinde etkili olan bu nörotransmitterler, stres, malabsorpsiyon, hastalık ve çeşitli genetik faktörler ve hipometilasyon nedeniyle azalmaktadır. Bu da depresyon, anskiyete, uykusuzluk, düşük bilişsel durum gibi etkilere neden olmaktadır. Bu sebeple metilasyonu gerçekleştirecek maddelerle bu durumun desteklenmesi ve semptomların önlenmesi gerekmektedir (Miller, 2008).

3-Trans-aminopropilasyon: SAmE'nin dekarboksilasyonu vasıtasıyla sentezlenen poliaminler, spermidin, spermin, putresindir. Spermidin ve spermin poliaminleri, hücre büyümesinin kontrolünde etkilidir; analjezik ve antieflamatuvar etkilere sahip oldukları da gösterilmiştir (Bottiglieri, 2002).



SAMe'nin moleküler yapısının 1952 yılında keşfedilmiş olmasına rağmen 1973 yılına kadar herhangi bir klinik çalışması bulunmamaktadır. SAMe doğal formunda stabil olmayan ve hızla degrade olan bir moleküldür. İlk klinik çalışmaları SAMe'nin stabil tuz formlarının oluşturulmasından sonra gerçekleştirilmiştir. Farmasötik formülasyonlarında da kullanılan stabil tuz formları, toluen sülfonat, tosilat disülfat ve 1,4-bütan disülfonat tuzlarıdır. SAMe'nin biyokimyasal reaksiyonlarına dayanarak tanımlanan klinik kullanım alanları depresyon, osteoartrit, demans ve karaciğer

hastalığını içermektedir. SAME'nin antidepresan etkisi özellikle ilgi çekmektedir; çünkü depresyonla birlikte folat eksikliğinin yüksek insidansı gözlenmektedir ve SAME ve folat arasında yakın bir metabolik ilişki söz konusudur. SAME, vitamin B12 ve folat (vitamin B9) ile çalışmaktadır; herikisinden birisindeki eksiklik vücutta SAME düzeyini azaltabilmektedir. Deney hayvanlarında yürütülen çalışmalar, folat eksikliğinin beyinde SAME konsantrasyonlarını azaltabildiğini göstermiştir. Folat eksikliği olan hastaların serebrospinal sıvılarında SAME ve serotonin-dopamin metabolitlerinin önemli derecede düşük konsantrasyonlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Bottiglieri, 2002; Cantoni, 1952; Delle Chiaie, 2002; Fazio, 1973), yaptıkları çalışmada, major depresyon tanısı konmuş hastaların 143'üne oral SAME (1600 mg/gün; 6 hafta), 138'ine oral imipramin (150 mg/gün; 6 hafta), 147'sine i.m. SAME (400 mg/gün; 4 hafta) ve 148'ine oral imipramin (150 mg/gün; 4 hafta) uygulamışlardır. Depresyon cevaplarında SAME'nin, imipraminle eşit etki göstermesine rağmen yan etki açısından daha tolere edilebilir olduğu kanıtlanmıştır. (Cerutti, 1993) doğum yapmış 190 depresif bayan üzerinde yaptığı çalışmada, SAME'nin plaseboya göre yüksek etkinliği kanıtlanmıştır. Sarris, (2014), 144 major depresyonlu hastada yaptığı 12 haftalık çalışma sonunda da SAME, essitalopram'a eşit, plasebodan üstün bulunmuştur. Son yıllarda yapılan önemli çalışmalara göre SAME, serotonin geri alım inhibitörlerine cevap vermeyen major depresyonlu hastalarda ek tedavi olarak kullanımda plaseboya karşı önemli üstünlük göstermiştir (Dording, 2012; Levkovitz, 2012; Papakostas, 2010).

Amerika'da Mart-1999'dan beri besin desteği olarak SAME preparatları mevcuttur. Avrupa'da bazı ülkelerde 1979'dan itibaren mevcut olduğu belirtilmektedir. SAME'nin farmasötik dozaj formları intravenöz, intramüsküler ve peroral formlardır. Ayrıca folik asit ve B12 vitamini ile birlikte SAME içeren bir dilaltı tableti de bulunmaktadır.

Depresyon ve demans tedavisinde günde bir kez 200 mg dozda ve enterik kaplı tabletleri olarak oral yolla verilşte günde iki veya üç kez 400 mg dozlarda SAME kullanımı önerilmektedir (Bottiglieri, 2002; Cantoni, 1952). SAME, sirkadyen ritme uygun olarak sentezlenmektedir. Sirkadiyen ritimde çok önemli olan melatoninin

biyosentezine katılmakla beraber melatoninle ters olarak sentezlenmektedir. Gece SAME oranı düşükenken melatonin yüksek, gündüz melatonin düşüken SAME (biyosentezine katıldığı için) yüksektir. Bundan dolayı SAME'nin gece alınmaması, sabah alınması tavsiye edilmektedir (Guchhait, 1981; Sitaram, 1995) . SAME, en ciddi yan etkisi maniklik olmak üzere, baş ağrısı, mide bulantısı, kusma, terleme, diyare gibi düşük ve tolere edilebilir yan etkilere sahiptir. Homosistein düzeyleri, koroner ateroskleroz gelişiminde etkili olabileceğinden, SAME kullanımında, SAME'nin homosisteine dönüşümünün homosistein düzeylerini artırıp artırmayacağı veya koroner arter hastalığı gelişiminde bir etkiye sahip olup olmadığı bilinmemektedir. Bazı klinik çalışmalar aksini iddia etseler de genel kanı manik ve bipolar kişilerde kontrendike olduğu yönündedir. Yine bazı klinik çalışmalarda ise bu etkinin tedavi süresi uzarken kaybolduğu gözlenmiştir. Yapılan klinik çalışmalarda SAME ve olası metabolitlerinin toksik olmadığı kanıtlanmıştır. Ayrıca çocuklarda ve hamilelerde yapılan az sayıda çalışmada güvenilir olduğu bulunmuştur (Gaster, 1999; Gören, 2004; Popper, 2013). SAME'nin depresyon etkisi üzerinde yapılan klinik çalışmalar Çizelge 1.10'da verilmiştir.

1.5.2.SAMe'nin Farmakokinetik Özellikleri

Absorpsiyon: S-Adenozilmetiyonin 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. İntramüsküler verilişte mutlak biyoyararlanımı %80-90 olarak bulunmuştur (García-Trevijano, 2000; Macdonald, 2011; McMillan ve ark., 2005; Zappia, 1987).

Metabolizasyon: SAMe taşıdığı pozitif yüklü sülfonyum iyonundan dolayı vücuttaki birçok biyokimyasal reaksiyonda rol oynamaktadır. Vücutta ATP'den sonra en çok kullanılan ikinci substrattır (Fontecave, 2004). SAMe, S-adenozilhomosistein'e (SAH) metabolize olmakta ve bu da daha sonra homosisteine dönüşmektedir. Bu dönüşüm sırasında vitamin B12, folik asit ve betain kofaktör olarak etki gösterir.

Eliminasyon: Sağlıklı gönüllüler üzerinde i.v. enjeksiyon ile yapılan farmakokinetik çalışmalarda, SAMe'nin renal eliminasyondan daha çok metabolizma yoluyla elimine edildiği gösterilmiştir (Giulidori, 1984).

Dağılım: Yapılan farmakokinetik çalışmalarla SAMe'nin dağılımının iyi olduğu, serum proteinlerine bağlanmasının ihmal edilir düzeyde olduğu gösterilmiştir. Beyine ise özel transport sistemiyle geçtiği literatürlerde gösterilmiştir (Giulidori, 1984; McMillan ve ark., 2005).

Çizelge 1.10. SAMe'nin depresyon etkisi üzerine yapılan klinik çalışmalar.

Literatür	Çalışma Dizayını	Hasta sayısı	Sonuç
(Caruso ve ark., 1984)	Çift kör	49	49 depresyonun eşlik ettiği romatoid artritli hastada 21 günlük SAM-e uygulamasının ardında depresyon seviyelerinde plaseboya göre ciddi düşüş görülmüştür.
(Criconia ve ark., 1994)	Tek kör	55	Beck depresyon ölçeğine göre depresyon yanıtında parenteral ve oral uygulanan SAM-e'yle ciddi düşüş görülmüştür.
(Ancarani ve ark., 1993)	-	53	Uzun süreli intravenöz uygulama plaseboya göre üstün çıkmıştır.
(König , 1987)		108	2 yıl boyunca osteoartritli hastalarda günlük 400 mg oral tablet kullanımından sonra mental durum ve şikayet sayıları önemli ölçüde azalmış ve ciddi yan etkiler görülmemiştir.
(Schifano ve Garofoli, 1993)	Tek kör	51	Alkolizme eşlik eden depresyonda kullanılan dotiepin ve SAM-e iki hafta boyunca uygulanmış, etkileri eşit bulunmuştur.
(Sarris ve ark., 2014)	Çift kör	144	12 haftalık çalışma sonunda SAMe'nin, esitalopram'a eşit, plasebodan üstün etkisi bulunmuştur.
(Levkovitz ve ark., 2012)	Çift kör	46	Serotonin geri alım inhibitörüne cevap vermeyen major depresyonlu hastalarda ek tedavi olarak plaseboya karşı önemli gelişme görülmüştür.
(Papakostas ve ark., 2010)	Çift kör	73	Serotonin geri alım inhibitörüne cevap vermeyen major depresyonlu hastalarda ek tedavi olarak plaseboya karşı önemli gelişme görülmüştür.
(Delle Chiaie ve ark., 2002)	Çift kör	143 oral SAM-e (6 hafta) 138 imipramin (6 hafta) 147 im SAM-e (4 hafta) 148 imipramin (4 hafta)	SAMe'nin imipraminle benzer etki gösterse de yan etki açısından daha tolere edilebilir olduğu kanıtlanmıştır.
(Shippy ve ark., 2004)	Açık etiket	20	HIV seropozitif ve depresyon tanısı konulmuş 20 kişiyle 8 hafta boyunca yapılan çalışmada oral SAMe, depresyon semptomlarını ciddi ölçüde düşürmüştür.
(Cerutti ve ark., 1993)	Çift kör	190	190 doğum yapmış kadın üzerinde yapılan çalışmada plaseboya göre çok ciddi sonuçlar alınmıştır.
(Dording ve ark., 2012)	Çift kör	73 (44kadın+29erkek)	Serotonin geri alım inhibitörüne cevap vermeyen tedavide ek olarak kullanımda seks fonksiyonunda önemli artış görülmüştür.

Birçok farmasötik preparatta kullanılan SAME stabilite açısından değişik sıcaklık ve pH değerlerinde yüksek kimyasal instabilite, diastereoizomerizm, alkali duyarlılığı, oksidasyon, termal degradasyon gibi problemler barındırmaktadır. Bu sebeplerden dolayı molekül üzerinde kimyasal modifikasyonlar yapılmış ve anyonik grubu daha yüksek maddelerle tuzları hazırlanmıştır. Birçok farklı tuzu olmasına rağmen stabilitesi ve güvenilirliği açısından SAME'nin 1-4 bütandisulfonat tuzu formülasyon çalışması için uygun bulunmuştur (Delle Chiaie, 2002).

1.5.3. SAME'nin Stabilitesi

SAME'nin, stabilite açısından gözönüne alınması gereken önemli yönleri bulunmaktadır (Desiderio ve ark., 2005). Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

- Yüksek kimyasal instabilite
- Diastereoizomerizm
- Alkali duyarlılığı
- Oksidasyon
- Termal degradasyon

S-Adenozil-L-metiyonin, α -amino ve sülfonyum izomer merkezlerini taşıması nedeniyle diastereoizomerik özellik göstermektedir ve S,S izomeri aktifken R,S izomeri inaktiftir. Farmasötik preparatlarda S,S ve R,S izomerleri karışım halinde verilmektedir ve yukarıdaki nedenlerden kaynaklı stabilite sorunlarında bu formların oranlarında değişimler görülmektedir.

Tez çalışmasında oral yolla verilişte stabil olmaması, düşük permeabilitesi ve karaciğerde ilk geçiş etkisine uğraması nedeniyle düşük biyoyararlanıma sahip SAME'nin biyoyararlanımını artırmak için farklı formülasyon yaklaşımlarının araştırılması ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu formülasyon yaklaşımı, etkin maddenin, ilk geçiş etkisini önlemek üzere, kolonda salımını sağlayacak partiküler dozaj formlarının hazırlanması temeline dayanmaktadır.

Bu sayede:

- Depresyonda kullanılan konvansiyonel ilaçların yan etkileri ile karşılaştırıldığında daha düşük yan etki profili gösteren etkin, emniyetli ve endojen bir madde olan SAME'nin antidepresan olarak kullanımında yararlığı artırılacaktır.
- Prebiyotik etkili taşıyıcı materyaller kullanılarak bağırsak florası sağlığı korunurken, dolaylı olarak ruh sağlığının korunmasında sinerjik etki sağlanacaktır (enterik sinir sistemi ilişkisi).
- Etkin madde, konvansiyonel antidepresanlara göre pahalıdır. Fakat biyoyararlanımını artırarak ve dozunun azaltılması ile maliyetin düşürülmesi planlanmaktadır.

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Akışkan Yatak Cihazı	Mini Glatt (Almanya)
Bifenil ters faz HPLC kolonu	Kinetex bifenil (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) (ABD)
Cam malzemeler	Ildam (Türkiye), Pyrex (ABD)
C18 ters faz HPLC kolonu	Supelco Discovery (C18 ters faz ; 250 mm x 4,6 mm x 5 µm) (ABD)
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Shimadzu DSC 60 (Japonya)
Diyaliz membran (Molecular mass cutoff: 12.000 Da)	Spectra/Por (ABD)
Diyaliz membran klipsleri	Sigma-Aldrich (Almanya)
Geçirimli elektron mikroskobu (Transmission electron microscope-TEM)	FEI Tecnai G2 Spirit Bio (TWIN) (Hollanda)
Hassas terazi	Sartorius BL 210 S (Almanya)
İnert pelletler	Dow (ABD)
İnsülin İğnesi	1 ml, Microfine plus (İngiltere)
Liyofilizatör	Chriss Gamma 2-16 LSCplus (İngiltere)
Manyetik karıştırıcı	Heidolph (Almanya)
Membran filtre (Selüloz asetat)	0,45 µm; Minisart; Sartorius (Almanya)
Mikropipetler (10-100 µl ve 100-1000 µl)	Rainin (ABD)
Mikropipet uçları (10-100 µl ve 100-1000 µl)	LP Italiana Spa (İtalya)
Optik Mikroskop	Leica (Almanya)
Paket Programlar	SPSS 13 (ABD) STATISTICA 8.0; Stat Soft. Inc. (ABD) Kinetika-ThermoFisher Scientific (ABD)
pH-metre	Hanna Instrument, HI83141 (ABD)
Su arıtma sistemi	Milipor Mili-Q Plus System-(Fransa)
Taramalı elektron mikroskobu	ZEIS Evo-40(USA)
Ultrasontrifüj cihazı	Hettich-Mikro 12-24 (ABD)
Ultrasonik homojenizatör (Prob sonikatör)	Bandelin Sonoplus HD 2070 (Almanya)
Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC 30 (Almanya)
X-Işını kırınım cihazı	Rigaku T01451 (Japonya)
Vorteks	Heidolph reax-top (Almanya)
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Agilent 1260 Infinity (ABD)

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Shimadzu Prominence-LC2030C (Japonya)
Zeta potansiyel ve partikül büyüklüğü ölçüm cihazı Nano ZS, Malvern (İngiltere)

2.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum asetat	Merck (Almanya)
Asetonitril (HPLC grade)	Sigma Aldrich (ABD)
Aseton	Fluka (ABD)
Baryum klorür	Aklar Kimya (Türkiye)
Diklorometan	Merck (Almanya)
Etanol	Aklar Kimya (Türkiye)
Eudragit FS 30D	Evonik (Almanya)
Eudragit L30D-55	Evonik (Almanya)
Gluteraldehit	Sigma Aldrich (ABD)
Heptanesülfonik asit sodyum tuzu	Merck (Almanya)
Hidroklorik asit (%37 a/h)	Riedel de Häen (Almanya)
Hidroksi Propil Metil Selüloz (HPMC)	Dow (ABD)
İnert pellet	FMC(Belçika)
İnülin	Sigma Aldrich (ABD)
Kalsiyum klorür dihidrat	Aklar Kimya(Türkiye)
Magnezyum klorür	Aklar Kimya(Türkiye)
Magnezyum sülfat	Merck (Almanya)
Metanol	Riedel de Haen (Almanya)
N,N karbonildiimidazol (CDI)	Sigma Aldrich (ABD)
N-hidroksisüksinimid (NHS)	Fluka (ABD)
Pektin	Sigma Aldrich (ABD)
Pharmacoat 606	Shin-Etsu (Japonya)
PlasACRYL T20	Evonik (Almanya)
Polietilen Glikol 6000	Sigma (ABD)
Poloksamer 188	Sigma(ABD)
Potasyum fosfat monobazik	Daejung (Japonya)
Protasan UP 214 CL	NovaMatrix (Norveç)
S- adenoilmetiyonin 1,4 butanedisülfonat	Carbosynth NA (İngiltere)
Sodyum bikarbonat	Merck (Almanya)
Sodyum fosfat dibazik	Fluka (ABD)
Sodyum hidroksit	MolyChem (Hindistan)
Sodyum tripolifosfat	Sigma (ABD)
Sitrik asit	Aklar Kimya (Türkiye)
Sodyum klorür	Merck (Almanya)
Sodyum lauril sülfat	Emir Kimya (Türkiye)
Trifloroasetik asit	Merck (Almanya)
Trikloroasetik asit	Merck (Almanya)
Trietil sitrat	Merck (Almanya)
Tetrahidrofuran	Sigma Aldrich (ABD)

Tripolifosfat (TPP)	Sigma Aldrich (ABD)
Tween 20	Merck (Almanya)
Tween 80	Merck (Almanya)
Vanilin	Sigma Aldrich (ABD)
1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC)	Sigma Aldrich (ABD)

2.3.Çalışmalarda Kullanılan Ortamların Bileşimi ve Hazırlanması

1N NaOH çözeltisi

NaOH.....44 g
Distile su.....y.m..... 1000 ml

Hazırlanışı: Sodyum hidroksit distile suda çözülür ve çözeltinin hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

1N HCl çözeltisi

Derişik HCl çözeltisi.....85 ml
Distile su.....y.m..... 1000 ml

Hazırlanışı: Derişik HCl çözeltisinden alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Suni Mide Ortamı - pH 1,2 (SGF)

Derişik hidroklorik asit çözeltisi.....7 ml
Sodyum klorür.....2 g
Distile su.....y.m..... 1000 ml

Hazırlanışı: Sodyum klorür distile suda çözülür, derişik hidroklorik asit çözeltisi ilave edilir, pH'sı 1,2'ye ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Suni Kolonik Ortam 1- pH 7,0 (SCoF1)

Potasyum klorür.....0,20 g
Sodyum klorür.....8,00 g
Potasyum fosfat monobazik.....0,24 g
Sodyum fosfat dibazik1,44 g
Distile su.....y.m.....1000 ml

Hazırlanışı: Potasyum klorür, sodyum klorür, potasyum fosfat monobazik, sodyum fosfat dibazik distile suda çözülür, pH'sı 7'ye ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır (Marques, 2011).

Suni Kolonik Ortam 2 - pH 5,8 (SCoF2)

Asetik asit.....10,21 g
Sodyum hidroksit.....6,28 g
Distile su.....y.m.....1000 ml

Hazırlanışı: Asetik asit ve sodyum hidroksit distile suda çözülür, çözelti pH'sı 5,8'e ayarlanır. Daha sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır (Marques, 2011).

In vitro HPLC Analizi için Mobil Faz Çözeltisi – pH 5,4

Amonyum asetat.....3,854 g
Trifloroasetik asit.....10 ml
Distile su.....y.m.....1000 ml

Hazırlanışı: Hesaplı miktar amonyum asetat bidistile suda çözülür, %1 h/h trifloroasetik asit (TFA) ilave edilir. Çözeltinin pH'sı 5,4'e ayarlanır ve bidistile su ile

1000 ml'ye tamamlanır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışmaları için mobil faz olarak hazırlanan bu tampon çözeltisi kullanılmadan önce 0,2 µm - selüloz asetat membrandan süzülür ve 15 dk ultrasonik banyoda degaze edilir (Zhang ve Klinman, 2015).

Plazmada HPLC Analizi için Mobil Faz Çözeltisi – pH 6,0

Heptanesülfonik asit sodyum tuzu.....6 g
Potasyum dihidrojen sülfat.....2 g
Metanol.....200 ml
Distile su.....y.m.....1000 ml

Hazırlanışı: Hesaplı miktar heptanesülfonik asit sodyum tuzu ve potasyum dihidrojen sülfat bidistile suda çözülür ve 200 ml metanol ilave edilir. 1 N NaOH ile pH'sı 6'ya ayarlanır ve bidistile suyla istenen hacme tamamlanır. HPLC çalışmaları için mobil faz olarak hazırlanan çözelti kullanılmadan önce 0,2 µm - selüloz asetat membrandan süzülür ve 15 dk ultrasonik banyoda degaze edilir (Poirier ve ark., 2001).

2.4. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi

2.4.1. SAME'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi

SAMe'nin su ile çözeltileri hazırlanmış ve Bölüm 2.3'te verilen mobil faz kullanılarak UV dedektörü ile 200 – 400 nm arasında spektrumu alınmıştır; maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{max}) belirlenmiştir. SAMe'nin S,S ve R,S olmak üzere iki tip diastereoizomeri olduğundan yapılacak analizlerde SAMe'nin bu diastereoizomerlerini ayırmak ve aktif olan S,S miktarlarını tayin etmek gerekmektedir.

Öncelikle SAME'nin su içinde 5 µg/ml konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. HPLC'de mobil faz akış hızı, enjeksiyon hacmi gibi parametreler değiştirilerek iki diastereoizomerin belirgin şekilde ayrılacağı koşullar belirlenmiştir.

2.4.2. 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 (2,5-10 µg/ml) bir seri çözelti hazırlanmıştır. Çözeltilerin maksimum absorbands verdiği dalga boyunda ($\lambda_{\max}$) analizleri yapılmış ve bilinen konsantrasyonlar x eksenine, buna karşılık okunan S,S ve R,S diastereoizomerlerinin alan değerleri toplamı y eksenine koyularak SAME'nin standart doğrusu çizilmiştir. Bunların yanında alıkonma zamanları da kaydedilmiştir. İşlemler üç farklı stok çözelti üzerinde çalışılarak yürütülmüştür. S,S ve R,S izomerlerinin alan değerlerinin toplam içindeki yüzdesinden hareketle herbir izomerin yüzdesi hesaplanmıştır.

2.4.3. SAME'nin Su, SGF ve SCoF2 Ortamlarında UV Spektrofotometrisi Analizi

SAME'nin su, SGF ve SCoF ortamlarında, 50 µg/ml konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin 200 – 400 nm arasında spektrumu alınarak maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) tayin edilmiştir.

2.4.4. SAME'nin Su, SGF ve SCoF2 Ortamındaki Standart Doğrularının Hazırlanması

SAME'nin su, SGF ve SCoF2 ortamları içinde hazırlanan 50 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltilerinden yapılan seyreltmelerle farklı konsantrasyonlarda (2,5-50 µg/ml) bir seri çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin maksimum absorbands verdiği dalga boyunda ($\lambda_{\max}$) analizleri yapılmış ve bilinen konsantrasyonlar x eksenine, buna karşılık okunan absorbands değerleri y eksenine konularak standart doğruları çizilmiştir. İşlemler üç farklı stok çözelti üzerinde çalışılarak yürütülmüştür.

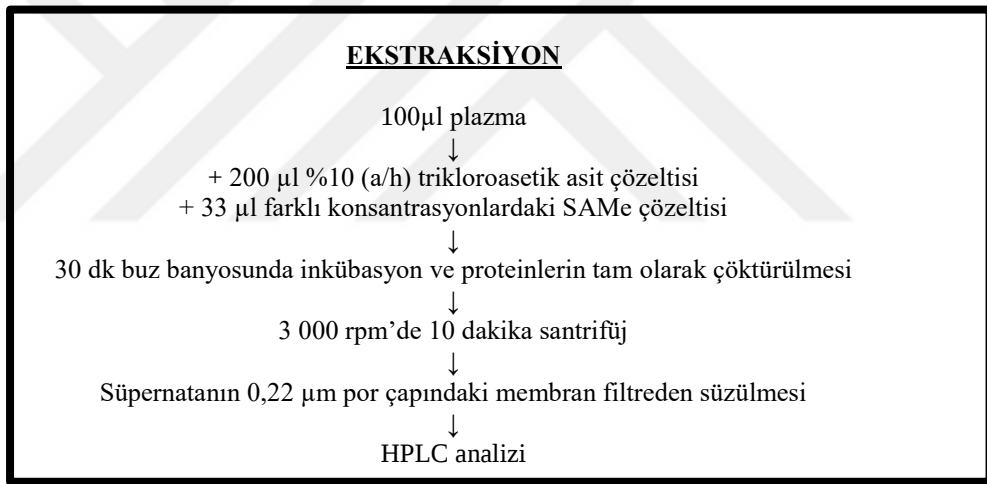
Çalışmada iki farklı kolon ortamında çözünme hızı yapılması planlanmıştır. Ancak SAME'nin HPLC ile yapılan stabilite çalışmalarının sonuçlarına göre suni kolon ortamı olarak SCoF1'de (pH 7) stabilitesinin düşük oluşundan dolayı SCoF2 (pH 5,8) kullanılmıştır.

2.4.5. SAME'nin Plazma Ortamındaki HPLC Analizi

SAME'nin Şekil 2.1'de gösterilen ekstraksiyon protokolüne uygun olarak hazırlanan plazma içindeki çözeltilerinin HPLC koşullarında UV dedektörü ile 200 – 400 nm arasında spektrumları alınmıştır; maksimum absorbands gözlenen dalga boyu ($\lambda_{\max}$) belirlenmiştir. Öncelikle SAME'nin su içinde 5 µg/ml konsantrasyonda çözeltileri hazırlanıp plazmaya ilave edilmiştir. HPLC'de mobil faz akış hızı, enjeksiyon hacmi gibi parametreler değiştirilerek SAME'nin belirgin şekilde ayrılacağı koşullar belirlenmiştir.

2.4.6. SAME'nin HPLC ile Plazmadaki Standart Doğrularının Hazırlanması

SAMe'nin su içerisinde 40 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış ve bu stok çözeltiden yapılan seyreltmelerle farklı konsantrasyonlarda (0,10-20 µg/ml) seri çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra Şekil 2.1'de belirtilen ekstraksiyon prosedürüne göre standart çözeltileri elde edilmiştir. SAMe'nin endojen bir madde olmasından dolayı, t=0 anında elde edilen alan değerleri standart çözeltilerinden okunan alan değerlerinden çıkarılmıştır. Elde edilen alan değerleri (y), bilinen SAMe konsantrasyonlarına (x) karşı grafiğe geçirilerek SPSS istatistik programı yardımıyla standart doğruları çizilmiştir. Sonuç standart doğrusu güven sınırı (% 95) içerisinde belirlenmiştir. Bunların yanında alıkonma zamanları da kaydedilmiştir. Analizlerde 3 paralel çalışılmış ve plazmadan gelebilecek kalıntılar için ön kolon kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Ekstraksiyon yöntemi akış şeması.

2.5. SAMe'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonları

Analitik validasyon parametreleri olarak doğrusalılık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik), teşhis sınırı (LOD) , tayin sınırı (LOQ) ve sistem uygunluğu incelenmiştir. Bu parametrelerin değerlendirilmesinde kullanılan kabul kriterleri resmi kılavuzlar, kitaplar ve bilimsel çalışmalar referans alınarak belirlenmiştir (Özkan ve ark., 2011; Food and Drug Administration, 2019;

European Medicines Agency, 2019; Shabir, 2004; Center for Drug Evaluation and Research, 2019; International Center of Harmonization, 2019) .

Doğrusallık ve Aralığı

Doğrusallık bir analitik işlemin numunedeki madde konsantrasyonu ile orantılı bir şekilde test sonuçlarını verebilmesidir. Aralık ise uygun kesinlik, doğruluk ve doğrusallığı sağladığı gösterilen analitik işlem için numunedeki maddenin en yüksek ve en düşük konsantrasyonları arasındaki aralıktır. SAME'nin farklı ortamlarda miktar tayininde kullanılacak olan standart doğrularını tespit etmek amacıyla Çizelge 2.1'de belirtildiği şekilde stok çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiler yine kendi ortamıyla seyreltilmek suretiyle aynı çizelgede verilen aralıklarda seri çözeltileri hazırlanmıştır. Plazma ortamında analiz için ise suda hazırlanan seri çözeltiler Şekil 2.1'de verilen şemaya göre plazma içinde hazırlanmıştır. Bilinen konsantrasyonlar x ekseninde, elde edilen alan değerleri toplamı y ekseninde grafiğe geçirilerek SPSS istatistik programı yardımıyla standart doğruları çizilmiştir. Sonuç standart doğrusu güven sınırı (% 95) içerisinde belirlenmiştir.

Doğruluk

Kabul edilen değer ile doğru denkleminde elde edilen değer arasındaki yakınlığın ölçüsüdür. SAME'nin miktar tayininde kullanılacak olan standart doğrulardan elde edilen doğruluk ve yüzde geri eldeyi tespit etmek amacıyla SAME'nin yüksek, orta, düşük olmak suretiyle üç farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar Çizelge 2.1'de görülmektedir. Ölçümler tekrarlı olarak yapılmıştır ve buradan % geri elde, standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (BSS) hesaplanmıştır. HPLC ile su ortamında yapılan ölçümlerde S,S ve R,S diastereoizomerlerinin alan değerleri toplamı standart doğru denkleminde yerine konarak toplam SAME miktarı ve alan yüzdelerinden yararlanılarak ayrı ayrı konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

Kesinlik

Geliştirilen yöntem kullanılarak aynı numuneden yapılan çoklu örnekleme nin doğruluğunun ölçüsüdür. Ölçü olarak sonuçlar arasındaki % BSS kullanılır. Analizi yapılacak çözeltinin en az 5-6 ölçümü yapılır. Kesinlik üç aşamada değerlendirilir:

Tekrarlanabilirlik (repeatability)

Ara kesinlik (intermediate precision)

Tekrar edilebilirlik (reproducibility)

SAMe'nin miktar tayini yöntemlerinin kesinliğini tayin etmek için yöntemlerin tekrarlanabilirliği ve ara kesinlikleri incelenmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Aynı işlem koşullarının kısa zaman aralıklarında yapılan tekrarlı okumalarındaki kesinlik ölçüsüdür. Çizelge 2.1'de belirtildiği şekilde yapılan ölçüm değerleri standart doğru denklemlerinde yerlerine konularak bulunan konsantrasyonların % BSS değerleri bulunmuştur.

Çizelge 2.1. Farklı yöntemler ve farklı ortamlarda yapılan etkin madde miktar tayinlerinin analitik validasyonları için uygulama koşulları.

		Doğrusallık ve aralığı	Doğruluk	Kesinlik	
				Tekrarlanabilirlik	Ara kesinlik
	Stok çözelti	Konsantrasyon aralığı	Konsantrasyon	Konsantrasyon	Konsantrasyon
Spektrofotometri		n=3	5'er kez ölçüm	10 kez ölçüm	5 kez ölçüm
Su ortamı	50 µg/ml	2,5- 50 µg/ml	5 µg/ml 20 µg/ml 50 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
SGF	50 µg/ml	2,5- 50 µg/ml	2,5 µg/ml 30 µg/ml 50 µg/ml	35 µg/ml	25 µg/ml
SCoF2	50 µg/ml	2,5- 50 µg/ml	3,75 µg/ml 30 µg/ml 50 µg/ml	40 µg/ml	35 µg/ml
HPLC		n=3	5'er enjeksiyon	12 enjeksiyon	12 enjeksiyon
Su ortamı	50 µg/ml	0,5-10 µg/ml	1 µg/ml 4 µg/ml 8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml
		n=3	5'er enjeksiyon	10 enjeksiyon	5 enjeksiyon
Plazma ortamı	20 µg/ml (su)	0,01-2 µg/ml (plazma ile birlikte ekstraksiyon)	0,025 µg/ml 0,25 µg/ml 1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml

Ara kesinlik

Laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirlemek amacıyla yapılır. Farklı günler veya farklı analistler tarafından elde edilen sonuçlar değerlendirilir. % BSS değeri kullanılarak ifade edilir. Çizelge 2.1’de verilen işlem koşullarında farklı analistlerin hazırladığı çözeltiler ve ölçümleri ile incelenmiştir.

Teşhis ve Tayin Sınırları

Teşhis Sınırı (LOD)

Analizi yapılacak örneği tayin edebilen fakat nicel verilerle saptanamayan en düşük derişimdir. Bu değerin bulunmasında görsel değerlendirme yöntemi, HPLC için sinyal / gürültü oranına dayalı yöntem ve doğrusallık ve aralığındaki en düşük konsantrasyona karşılık ölçümlerin standart sapması – standart doğrunun eğimi ile hesaplama yöntemi gibi farklı yöntemler mevcuttur. Yapılan çalışmada LOD Eşitlik 4’te belirtilen denklem yardımıyla hesaplanmıştır (n=3).

$$LOD = \frac{SS}{m} \times 3.3$$

Eşitlik 4

SS: Standart Sapma

m : Eğim

Tayin Sınırı (LOQ)

Maddenin uygun kesinlik ve doğrulukta tayin edilebilen, doğrusallık sınırları içerisinde kantitatif olarak saptanabilen en düşük konsantrasyon derişimidir. Düşük konsantrasyonlu yapılar, safsızlıklar ve degradasyon ürün tayinlerinde sıkça kullanılan bir veridir. Bu değerin bulunmasında görsel değerlendirme yöntemi, sinyal/gürültü oranına dayalı yöntem ve doğrusallık ve aralığındaki en düşük konsantrasyona karşılık ölçümlerin standart sapması - eğim ile hesaplama yöntemi gibi farklı yöntemler

mevcuttur. Yapılan çalışmada LOQ Eşitlik 5’de belirtilen denklem yardımıyla hesaplanmıştır (n=3).

$$LOD = \frac{SS}{m} \times 10$$

Eşitlik 5

SS: Standart Sapma

m : Eğim

Sistem Uygunluk Testleri

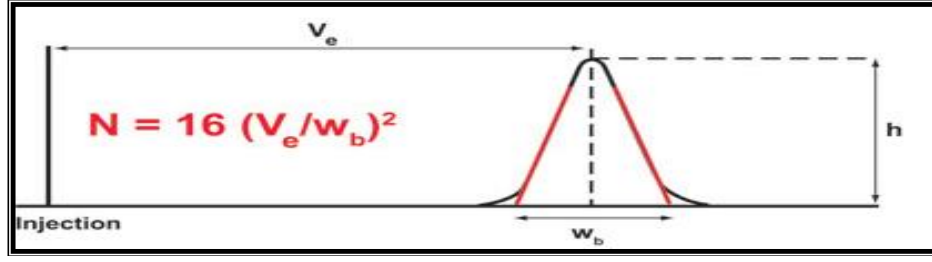
Sıvı kromatografisi ve diğer ayırma yöntemlerinin yeterli doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirtmek amacıyla Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) ve Amerikan Farmakopesi (USP) tarafından önerilen çalışmalardır (USP 40, 2017). Bu testlerle sıvı kromatografik sistemin yeterince doğru ve düzgün çalıştığı kanıtlanmış olur. Yapılan çalışmada su ortamında miktar tayini için HPLC cihazında aktif form olan S,S diastereoizomerinin uygunluk testleri kapsamında SAME’nin sudaki 8 µg/ml konsantrasyonda çözeltisi ile tekrarlanabilirlik (alan ve alıkonma zamanı), teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü belirlenmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında sudaki SAME’nin 8 µg/ml konsantrasyonundaki çözeltisinin 12 defa enjeksiyonu sonucunda belirlenen alan ve alıkonma zamanlarının % BSS değerleri belirlenmiştir.

Teorik Plaka Sayısı

Kolonun içinde çok fazla üst üste sıralandığı kabul edilen tabakalar olduğu varsayılır ve bunlar teorik plaka olarak isimlendirilir. Analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi deney koşullarına da bağlıdır. Kolonun verimliliği ile ilgili bir terimdir. USP 40’da (2017) belirtilen hesaplama yöntemi aşağıdaki gibidir (Şekil 2.2).



N = Teorik plaka sayısı
V_e=Alıkonma uzaklığı,zamanı(dk veya cm)
H= pik yüksekliği
W_b= Pik genişliği (ml, dk veya cm)

Şekil 2.2. Teorik plaka sayısının hesaplanması ve şematik gösterimi.

Stabilite Çalışmaları

Stabilite, etkin maddenin belirli bir süre ve koşullar altında yapısını bozunmadan muhafaza etmesidir. Etkin madde çözeltisinin belirli süreler içerisinde analiz edilmesiyle belirlenir. USP’de zorunlu bir validasyon parametresi olarak verilmesi de stabilite çalışmalarının yapılması önerilmektedir. Böylece gerek ölçüme kadar bekletilecek sürede, gerekse de preparat hazırlama koşullarının etkisi altında etkin maddenin stabilitesi belirlenmektedir. SAME stabilite açısından değişik sıcaklık ve pH değerlerinde,

- i) yüksek kimyasal instabilite
- ii) diastereoizomerizm
- iii) alkali duyarlılığı
- iv) oksidasyon
- v) termal degradasyon

gibi problemler barındırmaktadır (Desiderio vd., 2005). SAME, α-amino ve sülfonyum izomer merkezleri bulunduğundan dolayı diastereoizomerik özellik göstermektedir ve S,S diastereoizomeri aktifken, S,R diastereoizomerinin inaktif olduğu belirtilmektedir. Farmasötik preparatlarda S,S ve R,S diastereoizomerleri karışım halinde verilmektedir ve yukarıdaki nedenlerden kaynaklı stabilite sorunlarında bu formların oranlarında değişimler görülmektedir.

Stabilite çalışmaları SAME'nin su, SGF, SCoF1, SCoF2 ortamları içindeki 5 µg/ml konsantrasyondaki 10 ml'lik çözeltilerinin buzdolabında ($5\pm3^{\circ}\text{C}$), iklim dolabında ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, % 60 bağıl nem) ve etüvde ($37 \pm 2^{\circ}\text{C}$) 24 saat boyunca inkübe edilmesi şeklinde yürütülmüştür. Çözeltilerden belirli zaman aralıklarında (0, 8. ve 24. saat) örnekler alınarak HPLC'de analiz edilmiştir. Bunun yanısıra pektin nanopartiküllerinin imalat koşullarında sıcaklığın 55°C 'ye kadar çıkacak olmasından dolayı bu aşamadaki etkin madde stabilitesini tespit etmek amacıyla SAME, su ortamında, 55°C 'de, 6 saat inkübasyona bırakılmıştır; 6. saatin sonunda çözelti analiz edilmiştir (Dutta ve Sahu, 2012). Stabilite incelemeleri, etkin maddenin S,S ve R,S diastereizomerlerindeki konsantrasyonun değişiminin izlenmesi şeklinde yapılmıştır.

Ayrıca UV spektrofotometrisi ile de stabilite değerlendirmesi yapılmıştır. SAME'nin su, SGF ve SCoF2 ortamları içindeki 40 µg/ml konsantrasyondaki 10 ml'lik çözeltilerinin buzdolabında ($5\pm3^{\circ}\text{C}$), iklim dolabında ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, % 60 bağıl nem) ve etüvde ($37 \pm 2^{\circ}\text{C}$) 24 saat boyunca inkübe edilmesi şeklinde yürütülmüştür. Çözeltilerden belirli zaman aralıklarında (0, 8. ve 24. saat) örnekler alınarak UV analizleri yapılmıştır (Dutta ve Sahu, 2012).

2.6. Etkin Maddenin Piyasa Preparatı Üzerine İncelemeler

SAME'nin piyasadaki tek preparatı olan BIOSAME® üzerinde HPLC'de analizler yapışekil 1.5'ılmıştır. BIOSAME® Çizelge 2.2'de görüldüğü gibi SAME'nin yanısıra vitamin B12 ve folik asit içermektedir.

Çizelge 2.2. BIOSAME® etkin madde içeriği.

S-Adenozil-L-Metiyonin	200 mg
Vitamin B12	18 µg
Folik Asit	400 µg

Tablet formundaki piyasa preparatı havanda ezilerek toz haline getirilmiş, bu toz karışımı suda çözülmüş ve tabletteki çözünmeyen diğer maddeleri ayırmak için süzgeç kağıdından (Whatman No:42) süzölmüştür. HPLC analizinde S,S / R,S diastereoizomer konsantrasyonları tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan etkin maddenin S,S oranı ve S,S / R,S oranıyla karşılaştırılmıştır.

2.7. Formölasyon Çalışmaları

2.7.1.Kitozan Nanopartiköllerinin Hazırlanması ve Formölasyon Optimizasyonu

Kitozan nanopartiköller, suda çözünür kitozan klorür (Protasan UP 214 CL) kullanılarak iyonik jelasyon tekniğı ile hazırlanmıştır. Kullanılan kitozan klorürünün viskozitesi 20-200 mPa.s, molekül ağırlığı 150-400 kDa , deasetilasyon derecesi >%90'dır. Su içerisinde 1 ve 3 mg/ml kitozan klorür çözeltisi ve 0,5 mg/ml ve 1,0 mg/ml tripolifosfat (TPP) çözeltisi hazırlanmıştır. Çizelge 2.3'te verilen miktarlarda SAME, 15 ml kitozan çözeltisine eklenerek manyetik karıştırıcıda 400 rpm'de 2 dk süre ile karıştırılmıştır. Anyonik özellikteki 6 ml TPP çözeltisi, katyonik özellikteki kitozan-SAME çözeltisine insülin iğnesi yardımıyla 1,25 ml/dk hızda damla damla eklenmiş ve elektrostatik etkileşim sağlanmıştır. Elde edilen nanopartiköllerini çöktürmek için 26 000 rpm hızda, 1 saat, 10°C'de ultrasantrifüj uygulanmış ve süpernatant ayrılmıştır. Çöken etkin madde yüklü nanopartiköller 1,5 ml distile suda süspand edilerek -80°C sıcaklık ve 0,01 mbar basınç altında liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur. Çizelge 2.3'te X1, X2 ve X3 olarak gösterilen formölasyon parametrelerinin, bağımsız değişkenler olmak üzere, nanopartiköllerin partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, yükleme etkinliği ve işlem verimi gibi özellikleri (bağımlı değişkenler) üzerine etkisi çoklu lineer regresyon ile incelenmiştir (STATISTICA 8.0; Stat Soft. Inc., OK, USA).

Çizelge 2.3. Kitozan formülasyonlarının bileşimleri.

Formül kodu	Kitozan Konsantrasyon aralığı – mg/ml (15 ml ilave edilen) X_1	TPP Konsantrasyon aralığı - mg/ml (6 ml ilave edilen) X_2	SAMe miktarı – mg X_3
FK1	1	0,5	13,5
FK2	1	0,5	4,5
FK3	1	1	13,5
FK4	1	1	4,5
FK5	3	0,5	13,5
FK6	3	0,5	4,5
FK7	3	1	13,5
FK8	3	1	4,5

2.7.2. Pektin Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu

Pektin nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemi ile hazırlanmıştır ve bileşimleri Çizelge 2.4’te verilmektedir. Manyetik karıştırıcıda karışmakta olan I nolu pektin çözeltisine insülin enjektörü yardımıyla önce II nolu çözelti, ardından III nolu sodyum bikarbonat çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşan nanopartikül süspansiyonu $25\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 30 dk boyunca 600 rpm’de karıştırılmıştır (Chittasupho ve ark. 2013). Elde edilen pektin nanopartikülleri 13 000 rpm, 10 dk, 10°C ’de santrifüj edilmiş ve her seferinde 2 ml bidistile suyla 3 kez yıkanarak, tekrar santrifüj edilmiştir ve ayrılan süpernatantlar birleştirilmiştir. Çöken etkin madde yüklü nanopartiküller 1,5 ml distile suda süspande edilerek -85°C sıcaklık ve 0,01 mbar basınç altında liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur. Çalışmada öncelikle çapraz bağlayıcının belirlenmesi amacıyla FP1-FP4 formülleri denenmiş, formüllerin partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ölçülmüş ve yükleme etkinliği tayin edilmiştir. Daha sonra belirlenen çapraz bağlayıcı ile optimizasyon çalışması yapılmış ve FP5-FP12 kodlu formülasyonlara çoklu lineer regresyon analizi uygulanarak formülasyon parametrelerinin etkileri incelenmiştir (STATISTICA 8.0; Stat Soft. Inc., OK, USA).

Çizelge 2.4. Pektin nanopartikül formülasyonlarının bileşimleri.

	Bileşenler	FP1	FP2	FP3	FP4	FP5	FP6	FP7	FP8	FP9	FP10	FP11	FP12
	SAMe (mg)	15	15	15	15	30	15	30	15	30	15	30	15
I	Pektin (mg)	80	80	80	80	80	80	80	80	160	160	160	160
	Distile su (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	8	8	8	8
II	MgCl ₂ (mg)	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MgSO ₄ (mg)	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CaCl ₂ .2H ₂ O (mg)	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BaCl ₂ (mg)	-	-	-	40	40	40	80	80	40	40	80	80
	Distile su (ml)	4	4	4	4	4	4	8	8	4	4	8	8
III	NaHCO ₃ (mg)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Distile su (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

2.7.3.İnülin Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonu

İnülin nanopartikülleri oluşturmak amacıyla desolvasyon yöntemi uygulanmıştır. Hazırlanan formülasyonların bileşimleri Çizelge 2.5’te verilmektedir. Çizelgede belirtilen miktarlarda inülin ve SAMe su fazında çözölmüş ve 700 rpm’de karışmakta olan organik faza insülin iğnesiyle damla damla ilave edilmiştir. Organik fazda dağılan dispersiyon damlacıklarının sertleşmesi için su veya organik faza farklı çapraz bağlayıcılar (N,N-karbonildiimidazol (CDI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC), vanilin, N-hidroksisüksinimid (NHS), sitrik asit, glutaraldehit) eklenmiştir. Karışım, çeker ocak altında 25±2°C’sıcaklıkta 4 saat boyunca karıştırılarak organik fazın uçması sağlanmıştır (Jahanban-Esfahlan ve ark., 2016 ve Li ve ark., 2008) . Üretim işlemi 25±2°C’te gerçekleştirilmiştir. Ancak, CDI ve EDC için ilk 15 dk 2-8°C’te çapraz bağlanma reaksiyonu yürütölüp daha sonra 25±2°C sıcaklığa alınmıştır. SAMe ile iyon çifti oluşturulması amacıyla, anyonik yüzey aktif madde sodyum lauril sülfat (SLS) 300 µl formik asit yardımıyla organik fazda çözölerek iyon kompleksi oluşturulması sağlanmıştır. Organik fazın uçurulmasından sonra dispersiyon, 30 dk boyunca 20 000 rpm hızda, 10°C’de santrifüj edilerek nanopartiküller ayrılmıştır. Çöken etkin madde yüklü nanopartiküller distile

suda süspande edilmiş ve -85°C sıcaklık ve 0,01 mbar basınç altında liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur.

Çizelge 2.5. İnulin nanopartikül formülasyonlarının bileşimleri.

		FI1*	FI2**	FI3	FI4	FI5	FI6	FI7	FI8	FI9	FI10	FI11	FI12	FI13	FI14
Su fazı	SAMe(mg)	10	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
	SLS(mg)	-	-	-	-	-	-	-	12,5	12,5	-	-	-	12,5	12,5
	Inulin(mg)	160	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	250
	Gluteraldehit (ml)	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sitrik asit (mg)	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tween 20	-	-	-	-	%0,1	%0,1	-	-	%0,1	-	-	-	-	-
	CDI (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
	EDC (mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	5
	Su (ml)	8	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Organik Faz	Formik asit(µl)	-	-	-	-	-	-	-	300	300	-	-	-	300	300
	Vanillin (mg)	-	-	-	25	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-
	CDI(mg)	-	-	-	-	-	-	2	2	-	2	-	-	-	-
	NHS(mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
	THF (ml)	-	-	-	-	-	-	8	8	-	8	-	-	-	-
	Aseton(ml)	16	8	8	8	8	8	-	-	8	-	8	8	8	8

*Gluteraldehit konsantrasyonu: %25 a/h, **Gluteraldehit konsantrasyonu: %50 a/h; Kısaltmalar: SLS:Sodyum lauril sülfat; CDI: N,N karbodiimidazol, EDC: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid; NHS: N-hidroksisüksinimid; THF: Tetrahidrofuran

Çizelge 2.5'te yer alan formülasyonların partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ölçülmüş ve yükleme etkinliği tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara bağlı olarak SLS'nin SAMe ile 5:1 molar oranda birleşerek iyon çifti oluşturduğu formülasyon (FI14) temel alınarak bu formülasyonun optimizasyonu için üç düzey – iki faktörlü (3^2) bir tasarım yapılmıştır. Bu tasarımda SAMe miktarı ve SLS:SAMe molar oranı bağımsız değişkenler olarak alınmıştır. Bağımlı değişkenler, yani cevap faktörler olarak nanopartiküllerin karakterizasyon bulguları alınmıştır. Çoklu lineer regresyon ile değişkenler arasında korelasyonlar değerlendirilmiştir. Çizelge 2.6'da bağımsız değişkenler ve düzeyleri, Çizelge 2.7'de ise buna göre hazırlanan formülasyonlar verilmektedir.

Çizelge 2.6. Faktöriyel tasarım bağımsız değişkenleri ve düzeyleri.

Seviye	Bağımsız Faktörler		SLS:SAMe oranı (M)	
	SAMe Miktarı (mg)	Kod	X ₂	Kod
Düşük	25	-1	1	-1
Orta	50	0	3	0
Yüksek	75	+1	6	+1

Çizelge 2.7. İnülin nanopartikülleri tasarım formülleri.

	Bileşenler	FI15	FI16	FI17	FI18	FI19	FI20	FI21	FI22	FI23
Su fazı	SAMe(mg)	25	25	25	50	50	50	75	75	75
	SLS (mg)	29,80	14,90	4,966	59,60	29,80	9,932	89,40	44,70	14,90
	İnülin(mg)	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	EDC (mg)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Su (ml)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Organik faz	Formik asit (µl)	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	Aseton (ml)	8	8	8	8	8	8	8	8	8

2.8 .Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu

2.8.1.Etkin Madde İçeriği ve Yükleme Etkinliği Tayini

Kitozan Nanopartikülleri

Hazırlanan kitozan nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktar tayini için indirekt yöntem tercih edilmiştir. Ultrasantrifüj sonrası süpernatanda UV spektrofotometresinde tayin edilen etkin madde miktarı, nanopartiküllere yüklenemeyen etkin maddedir ve toplam etkin madde miktarından çıkartılarak başlangıçta ilave edilen etkin maddenin nanopartiküller içinde tutulan % miktarı bulunmuştur (n=3) (Eşitlik 6).

$$\% \text{ Yükleme Etkinliği} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad \text{Eşitlik 6}$$

A: Toplam etkin madde miktarı (mg)

B: Süpernatandaki etkin madde miktarı (mg)

Etkin madde içeriği ise elde edilen nanopartiküller içinde % ağırlık olarak etkin madde fraksiyonudur. Eşitlik 7’ten yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Etkin madde içeriği} = \frac{C}{D} \times 100 \quad \text{Eşitlik 7}$$

C: Nanopartiküller içinde tutulan etkin madde miktarı (mg)

D: Nanopartikül kütlesi (mg)

Pektin nanopartikülleri ve İnülin Nanopartikülleri

Hazırlanan pektin ve inülin nanopartiküllerinde yüklenen etkin madde miktar tayini için direkt yöntem tercih edilmiştir. Liyofilizasyondan sonra elde edilen kuru nanopartikül kütlesinde bulunan etkin madde miktarı belirlenerek etkin madde içeriği tayin edilmiştir. Bunun için liyofilize formdaki etkin madde yüklü nanopartikül formüllerinden 5 mg tartılmış, 1 ml metanolde 5 dk inkübe edilerek pektinin parçalanması sağlanmıştır, ardından 5 ml'ye distile suyla tamamlanarak 30 dk süre ile ultrasonik banyoda tutulmuştur; böylece etkin maddenin suya geçmesi sağlanmıştır. Polimerin uzaklaştırılması amacıyla 0,45 µm-membran filtreden süzülen numune UV spektrofotometrede etkin madde miktarının tayini amacıyla analiz edilmiştir. Eşitlik 7 yardımı ile içerdği etkin madde miktarı hesaplanmıştır (n=3).

2.8.2.Nanopartikül Üretim İşlemi Veriminin Tayini

Nanopartikül üretim işleminin verimi Eşitlik 8'den yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İşlem verimi} = \frac{NP}{\text{Total katı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 8}$$

NP : Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)

Total katı : Formülasyonda kullanılan total katı madde miktarı (mg)

2.8.3.Nanopartiküllerin Partikül Büyüklükleri ve Dağılımlarının İncelenmesi

Dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle ölçüm yapan zetasizer cihazı kullanılarak nanopartiküllerin partikül büyüklükleri, dağılımları ve polidispersite indeksleri tayin edilmiştir. Analizler 25°C'de He-Ne lazer (633 nm) ile 173°'lik saçılım

açısı ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül süspansiyonlarının ölçümünde tek kullanımlık zetasizer küvetleri kullanılıp, her bir numune için 6 ölçüm yapılmıştır.

2.8.4. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyellerinin Tayini

Nanopartikül formülasyonlarında zeta potansiyeli zetasizer cihazı ile tayin edilmiştir. Nanopartikül formülasyonlarında zeta potansiyeli ölçümü için cihaza ait özel küvetler kullanılarak her bir numune için 4 ölçüm yapılmıştır.

2.8.5. Nanopartiküllerden Etkin Madde Salım Tayini

Etkin madde salım tayini, çözünme testi cihazının mini kitleri kullanılarak döner palet yöntemi ile yapılmıştır. Saf etkin madde veya nanopartiküller çözünme ortamına, deneye başlamadan 12 saat önce ultra saf su içinde hidrate edilmiş diyaliz membran (cut-off 12000 Da) içinde 0,5-1,0 ml ultra saf su ile disperse edilerek, konmuştur. Çözünme hızı testi 2 saat 100 ml - SGF ortamında (37°C) yapıldıktan sonra, diyaliz membranlar 100 ml - SCoF2 ortamına (37°C) taşınmış ve çözünme hızı devam ettirilmiştir. Sırası ile 5.,10.,15.,30.,60.,90.,120.,180.,240.,360.,480. dakikalar ve 24. saatte 3 ml hacimde numuneler alınmıştır. Alınan miktarda taze numune ortama ilave edilmiştir. Alınan numuneler UV spektrofotometrede analiz edilerek gerekli hesaplamalar yapılmıştır .

Formülasyonların değerlendirilmesi ve uygun formülasyonun seçimi için çözünme hızı çalışmaları sonucunda elde edilen verilere Weibull kinetiği uygulanarak etkin maddenin % 63,2'sinin çözünmesine/salımına karşılık gelen süre (τ_d), Eşitlik 9 kullanılarak hesaplanmıştır (Yüksel ve ark., 2000).

$$\log[\ln(1/1-Q)] = \beta \log \tau - \beta \log \tau_d$$

Eşitlik 9

Q :Çözünen etken madde % 'si

β :Şekil faktörü

τ :Zaman - dk

τ_d :Etken maddenin % 63.2'sinin çözünmesi için geçen süre – dk

Her bir nanopartikül grubu için uygun formül seçilmesinden sonra, bu formülasyonla hazırlanan tüm nanopartiküllerin enzim içeren SGF ve SCoF2 ortamlarında da çözünme testi aynı şekilde yapılmıştır. SGF içine 0,1 mg/ml konsantrasyonda pepsin, SCoF2 içine ise pektin için 5,7 IU/ml miktarda pektinaz; inülin için 5 IU/mL inülinaz ilave edilmiştir. Bu testten alınan numunelerde etkin madde içeriği, pektinaz varlığında SAME'nin miktarının UV spektrofotometrik olarak tayin edilememesi nedeniyle HPLC yöntemi ile belirlenmiştir.

Enzimli ve enzimsiz ortamlarda uygulanan testler sonucunda salım profilleri arasındaki benzerliğin değerlendirilmesi amacıyla f_2 benzerlik faktörü hesaplanmıştır (Yüksel ve ark., 2000).

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left(1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Eşitlik 10

R_t : t anında enzimsiz ortamda çözünen % madde

T_t : t anında enzimli ortamda çözünen % madde

n: Çözünme ortamında alınan numune sayısı

2.8.6.Yapay Membran (PAMPA) Modeli Kullanılarak SAME Permeabilitesinin Tayini

Permeabilite çalışmasında filtreli 96 kuyucuklu plaka reseptör faz, 96 kuyucuklu plaka ise donör faz olarak kullanılmıştır; dondurucuda ($-20^\circ \pm 5$) saklanan kolonik

PAMPA sistemi dondurucudan çıkarılarak yarım saat $25\pm2^{\circ}\text{C}$ 'te bekletilmiştir. Daha sonra donör plakanın her bir kuyucuğunda 300 μl SCoF2 içinde 100 μg SAMe içerecek şekilde liyofilize haldeki FP9 (Çizelge 2.4) ve FI18 (Çizelge 2.7) formülasyonlarından tartılarak SCoF2 içinde disperse edilmiştir. Reseptör plaklara ise 200 μl SCoF2 ortamı koyulmuştur. Numune içeren donör plaka, membranın alt kısmı tamponla temas edecek şekilde reseptör plakanın üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra donör-reseptör sisteminin üzeri sıkıca kapatılarak buharlaşmanın önüne geçilmiştir. $25\pm2^{\circ}\text{C}$ 'te, çalkalayıcılı inkübatörde 25 rpm hızda karıştırılan sistemden 3, 6 ve 9. saatlerde numuneler alınmıştır ve UV mikroparka okuyucuda absorbanlar okunarak etkin madde miktarı hesaplanmıştır. Eşitlik 11'den faydalanılarak permeabilite katsayısı tayin edilmiştir (Squillante ve ark., 1998).

$$P = \frac{\frac{dQ}{dt}}{(AC_s)}$$

Eşitlik 11

P : Permeabilite katsayısı (cm/saat)

dQ/dt : Penetrasyon eğrisinin doğrusal kısmının eğimi ($\mu\text{g/saat}$)

1/A : Penetrasyon yüzey alanı (cm^2)

C_s : Başlangıç etkin madde konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)

2.9.Optimum Formülün Seçilmesi

Farklı polimerler kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında en yüksek yükleme etkinliği, işlem verimi ve en küçük partikül büyüklüğüne sahip formüller optimum formül olarak seçilmiştir. Bu kapsamda kitozan nanopartikülleri, düşük yükleme etkinliği, düşük işlem verimi ve zayıf tekrarlanabilirliği nedeniyle, bundan sonraki çalışmalara alınmamıştır.

Kitozanın dışında, yukarıda bahsedilen parametreler gözönüne alınarak pektin nanopartikülleri için **FP9**, inülin nanopartikülleri için **FI18** optimum formül olarak seçilmiştir. Tekrarlanabilirlik kapsamında formüllerden 3'er seri üretilerek nanopartiküllerin partikül boyutu, etkin madde içeriği, % yükleme etkinliği ve % etkin

madde içeriği incelenmiştir. Pektin nanopartiküllerinde çapraz bağlayıcı seçiminde üretimler üç tekrarlı yapıldığından tekrarlanabilirlik çalışması yapılmamıştır.

2.9.1.Seçilen Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesi

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) cihazında 2-10 mg aralığında tartılan maddeler için 20°C/dk hızda, 20-300°C aralığında termogramlar alınmıştır. Etkin maddenin, yardımcı maddelerin, formülasyondaki maddelerin fiziksel karışımlarının, nanopartikül formüllerinin DSC termogramları alınarak maddeler arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Fiziksel karışımlar, formülasyon bileşenlerinin orjinal formüldeki oranlarında, havanda homojen bir şekilde karıştırılmasıyla elde edilmiştir (Çizelge 2.8).

X Işını Toz Difraktometrisi (XRPD)

X ışını toz difraksiyometrisi (XPRD) ile etkin maddenin, yardımcı maddelerin, formülasyondaki maddelerin fiziksel karışımlarının ve nanopartikül formüllerinin kristal yapıları incelenerek aralarındaki etkileşimler değerlendirilmiştir (Çizelge 2.8). Numuneler spatül yardımıyla cihaza ait özel hazneye döküldükten sonra 30 kV, 15 mA ve 2-40° aralığında analiz gerçekleştirilmiştir (Rigaku MiniFlex XRD; Seri: 2005G303) .

Çizelge 2.8. Nanopartikül formülasyonlarında etkin madde ve yardımcı madde etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla DSC ve XRPD analizi için hazırlanan numuneler.

	Pektin Nanopartikülleri (FP9)	İnülin Nanopartikülleri (FI18)
a	SAMe	SAMe
b	Pektin	İnülin
c	Baryum klorür	SLS
d	Sodyum bikarbonat	EDC
e	FP9 formülasyonu	FI18 formülasyonu
f	SAMe, pektin, baryum klorür, sodyum bikarbonattan oluşan fiziksel karışım	SAMe, inulin, SLS ve EDC'den oluşan fiziksel karışım

2.9.2.Seçilen Nanopartikül Formülasyonlarının Görüntülenmesi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme

Seçilen nanopartikül formülleri, 2 ml suda disperse edilmiş, bu dispersiyonlar yapışkan karbon bant üzerine damlatılarak kuruması sağlanmıştır. Daha sonra kuruyan tozlar üzerine nanometre civarında altın kaplama yapılarak 20 kV, 10,5 mm mesafede tarayıcı elektron mikroskobunda (ZEIS, Evo-40) görüntüleme yapılmıştır.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Görüntüleme

Geçirimli elektron mikroskobu ile görüntüleme yapmak için suda disperse edilen nanopartikül formülasyonlarından bir damla karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılmıştır. Bir dakika beklenerek partiküllerin karbon substrata adhere olması sağlanmıştır. Formülasyonun fazlası filtre kâğıdı ile alınıp ve su tamamen uzaklaşınca kadar kurutulmuştur. Elektron mikroskobunda 120 kV’da inceleme yapılmıştır.

2.9.3.Seçilen Nanopartikül Formülasyonlarında Stabilite Çalışmaları

Stabilite tayini için liyofilize formda seçilen nanopartikül formülasyonları cam flakonlar içerisine koyulup ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra, buzdolabında $5\pm3^{\circ}\text{C}$ ’te ve oda sıcaklığı olarak $25\pm2^{\circ}\text{C}$, % 60 ± 5 bağıl nemdeki iklim dolabında 6 ay boyunca tutulmuştur; 1., 3. ve 6. ayın sonunda numuneler suda disperse edildikten sonra partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, yüklenme etkinliği, etkin madde içeriği ve SS/RS yüzde oranları (HPLC) test edilmiştir.

Pektin nanopartiküllerin stabilite çalışmalarında flakon içerisinde kalan hava nedeniyle etkin madde miktarında önemli değişiklikler olduğu görülmüştür. Bu iki formülde yapılan stabilite çalışmalarında formülasyonlar özel kaplara aktarılmış ve

havası alınarak hermetik olarak kapatılmıştır. Bu ambalaj içinde de nanopartiküller yukarıda belirtilen koşullar altında stabilite testine alınmıştır.

2.10.Etkin Madde Salımının Modifiye Edilmesi için Çalışmalar

SAMe'nin gastrointestinal sistemin üst kısımlarında ortaya çıkmasını engellemek, ilk geçiş etkisinin büyük oranda engellendiği kolonda salımını sağlamak için nanopartiküllerden etkin madde çıkışı modifiye edilmiştir. Bu kapsamda akışkan yatak ile pektin ve inülin nanopartikülleri inert pelletler üzerine kaplanmış, daha sonra bu kaplanmış formlar üzerine enterik kaplama gerçekleştirilerek salım modifikasyonu sağlanmıştır.

2.10.1.Akışkan yatak cihazında kaplama çalışmaları

Ön formülasyon çalışmaları

Nanopartikül formülasyonlarının inert mikrokristal selüloz pelletler üzerine yüklenmesi ve elde edilen mikropartiküllerin kolona spesifik bir polimerle kaplanmasında akışkan yatak cihazı kullanılmıştır. Alt kaplama işleminin optimizasyonu için suda çözünür bir boya (Scharlach GN) alt kaplama çözeltisinin içerisine katılarak bu çözelti pelletler üzerine kaplanmıştır. Alt kaplama çözeltisinin bileşimi aşağıda yer almaktadır:

Alt Kaplama Çözeltisi

Pharmacoat 606*.....28g

PEG 6000.....7 g

Suda çözünür boya.....y.m.

Su.....447g

(*:Hidroksipropil metil selüloz, %2'lik çözelti viskozitesi: 6 mPa.san, SD:2910).

Pharmacoat 606 manyetik karıştırıcıda bir miktar suda 30 dk boyunca karıştırılarak çözülmüştür. Daha sonra PEG 6000 bu çözeltinin üzerine ilave edilerek

geri kalan su, çözeltiye ilave edilmiş ve renklenmesini sağlamak amacıyla bir miktar suda çözünür kırmızı boya çözeltiye katılmıştır. Çizelge 2.9 ve Çizelge 2.10'da belirtilen proses parametreleri kullanılarak alt kaplama çözeltisi ile inert pelletler kaplanmıştır. Pelletler mikrokristal selülozdan üretilmiştir ve partikül çap aralığı 106-212 µm'dir. Kaplama işleminde üstten püskürtmeli akışkan yatak modülü kullanılmıştır (Şekil 2.3). Kolonda etkin madde salımının sağlanması amacıyla kaplı pelletler üzerine fonksiyonel kaplama yapılmıştır. Fonksiyonel kaplama çözeltisinin bileşimi aşağıda yer almaktadır:

Fonksiyonel Kaplama Dispersiyonu-1

Eudragit FS 30D*.....606,1g
PlasACRYL T20**.....90,9 g
Distile su.....303,0 g

(*:Metil akrilat, metil metakrilat ve metakrilik asit anyonik kopolimerinin sulu dispersiyonu;

**PlasACRYL™ T20: Gliserol monostearat, Trietil sitrat, Polisorbat 80)

Eudragit FS 30D suyla 10 dk karıştırıldıktan sonra PlasACRYL T20 süspansiyonuna eklenerek tüm karışım 10 dk boyunca karıştırılmıştır Hazırlanan bu dispersiyon akışkan yatak cihazına ait tygon borularda ve püskürtme başlığında tıkanıklıklara neden olmuş ve etkin kaplama sağlanamamıştır Bu nedenle Eudragit FS 30D yerine diğer bir enterik kaplama materyali olan Eudragit L30D-55 kullanılarak aşağıdaki kaplama formülasyonu oluşturulmuştur.

Fonksiyonel Kaplama Dispersiyonu-2

Eudragit L30D-55*.....578,7g
Trietil sitrat9,0 g
PlasACRYL T20.....86,5 g
Distile su.....325,8 g

(*Eudragit L30D-55:Metakrilik asit: etil akrilat – 1:1;)

Eudragit L 30D-55, su ve trietil sitrat 10 dk karıştırıldıktan sonra PlasACRYL T20 süspansiyonuna eklenmiş ve tüm karışım 10 dk daha karıştırılmıştır(Evonik

Industries, 2019). Akışkan yatak cihazında kaplama işleminde üstten püskürtmeli başlık kullanılmıştır (Şekil 2.3); uygulanan işlem parametreleri Çizelge 2.10’da verilmiştir.

Yapılan ön çalışmada kaplama sonunda elde edilen toz partiküllerin birbirine yapışmaması, renk tekdüzeliği görsel olarak değerlendirilmiş ve işlem verimi (Eşitlik 12) hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İşlem Verimi} = \frac{E}{F} \times 100$$

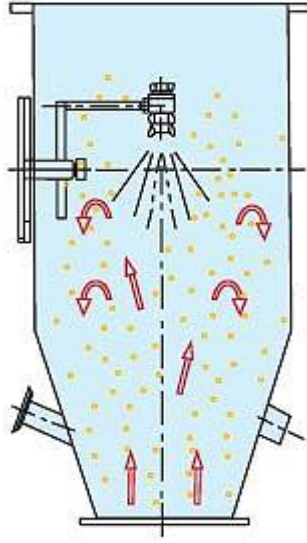
Eşitlik 12

E:Elde Edilen Kaplanmış Toz Miktarı

F: Toplam (Toz+ Kuru Bağlayıcı) Madde Miktarı

Çizelge 2.9. İnert pelletler üzerine kaplama prosesi parametreleri ön denemeleri.

İşlem No	Toz Miktarı (g)	Giren Hava Miktarı (m ³ /s)	Giriş Hava Sıcaklığı (°C)	Ürün Sıcaklığı (°C)	Atomize Hava Basıncı (bar)	Bağlayıcı Püskürtme Hızı (rpm)	Püskürtme Rejimi
P1	5	13.6	45	35	0.3	11	2dk püskürtme + 4dk kurutma
P2	5	13.6	50	40	0.3	11	2dk püskürtme +4dk kurutma
P3	5	13.6	45	35	0.3	8	2dk püskürtme + 4dk kurutma
P4	5	13.6	50	40	0.3	8	2dk püskürtme +4 dk kurutma
P5	5	13.6	50	40	0.3	10	2dk püskürtme + 4dk kurutma
P6	5	13.6	50	40	0.3	10	(1dk püskürtme+2dk kurutma) x 2
P7	5	13.6	50	40	0.3	10	1,5dk püskürtme+4dk kurutma
P8	5	13.6	50	40	0.3	10	1,5dk püskürtme+4dk kurutma
P9	5	13.6	50	40	0.3	10	(1,5dk püskürtme+4dk kurutma) x 2
P10	5	13.6	50	40	0.5	10	1,5dk püskürtme+4dk kurutma
P11	5	13.6	50	40	0.5	10	1,5dk püskürtme+4dk kurutma) x 2
P12	5	13.6 18.6	50	40	0.5	10	1,5dk püskürtme+4dk kurutma) x 2
P13	4	13.6	50	40	0.5	10	1,5dk püskürtme+4dk kurutma) x 1 [HPMC] 1,5dk püskürtme+4dk kurutma)x3 [Eudragit]
P14	4	13.6	50	40	0.5	10	1,5dk püskürtme+4dk kurutma) x 1 [HPMC] 3dk püskürtme+4 dk kurutma) x 5 [Eudragit]
P15	4	13.6	50	40	0.5	10	1,5dk püskürtme+4dk kurutma) x 1 [HPMC] 11.5 dk püskürtme+4 dk kurutma [Eudragit]
P16	4	13.6	50	40	0.5	10	Aralıksız Eudragit püskürtme
P17	4	13.6	50	40	0.5	10	1,5dk püskürtme+7dk kurutma)x1 [HPMC] Aralıksız Eudragit püskürtme
P18	4	13.6	50	40	0.5	10/5	1,5dk püskürtme+4dk kurutma)x1 [HPMC] 30 dk aralıksız püskürtme [Eudragit]
P19	4	13.6	50	40	0.5	10	1,5dk püskürtme+4dk kurutma)x1 [HPMC] Aralıksız püskürtme [Eudragit]



Şekil 2.3. Akışkan yatakta kaplama işlemi.

Çizelge 2.10. İnert pelletler üzerine kaplama prosesi parametreleri.

Proses Parametreleri	Alt Kaplama	Fonksiyonel Kaplama
Pellet miktarı (g)	4	3,75
Giren Hava Miktarı (m ³ /s)	10	10
Giriş Hava Sıcaklığı (°C)	35-40	35-40
Çıkış Hava Sıcaklığı (°C)	34-35	34-35
Ürün Sıcaklığı (°C)	34-37	34-37
Atomize Hava Basıncı (bar)	0,5	0,5
Bağlayıcı Püskürtme Hızı (ml/dk)	0,5	0,5
Curing sıcaklığı(°C)/ süresi(dk)	45/ 10	45/10

Fonksiyonel Kaplama Oranının Belirlenmesi

Nanopartiküllerin inert pelletler üzerine kaplanmasına geçmeden önce saf SAME kullanılarak uygun kaplama oranları belirlenmiştir. Bu amaçla SAME alt kaplama çözeltisinde çözülerek pelletler üzerine püskürtülmüş, daha sonra fonksiyonel kaplama için Eşitlik 13 kullanılarak farklı kaplama oranları hesaplanmıştır. Farklı oranlarda kaplama yapılan pelletler üzerinde Bölüm 2.8.5’te belirtildiği şekilde çözünme hızı çalışmaları yapılmıştır. Bu çözünme hızı profillerine göre geciktirilmiş bir salım için farmakope limitlerine uygun profilin elde edildiği kaplama oranı kullanılarak

nanopartiküllerin pelletler üzerine kaplanması aşamasına geçilmiştir.

$$\% \text{ Kaplama oranı} = A/B \times 100$$

Eşitlik 13

A: Püskürtülen kaplama dispersiyonu katı kütlesi

B: Pellet, nanopartikül, ön ve fonksiyonel kaplamaya ait toplam katı kütlesi

Bunun için SAME içeren nanopartikül kütlesi (FP9 ve FI18) alt kaplama çözeltisinde disperse edilerek pelletler üzerine püskürtülmüştür. Daha sonra alt kaplama uygulanan pelletler üzerine belirlenen kaplama oranı kullanılarak fonksiyonel kaplama dispersiyonu püskürtülmüştür. Hazırlanan formülasyon bileşimleri Çizelge 2.11’de verilmiştir.

Eşitlik 13 kullanılarak hesaplanan % 7,12 a/a kaplama oranı için 3 ml, % 14,24 a/a kaplama oranı için 6 ml, % 21,36 a/a kaplama oranı için 9 ml dispersiyon, 4 g pellet üzerine uygulanmıştır. Formül kodları şu şekildedir:

K ₁ FI18	Alt kaplama ile FI18 formülü ile kaplanmış pelletler
K ₂ FI18	Fonksiyonel kaplama uygulanmış K ₁ -FI18 pelletleri
K ₁ FP9	Alt kaplama ile FP9 formülü ile kaplanmış pelletler
K ₂ FP9	Fonksiyonel kaplama uygulanmış K ₁ -FP9 pelletleri

Çizelge 2.11. Nanopartiküller kullanılarak kaplanmış pellet formülasyonları.

	Miktar (mg)	K _{1/2} FI18	K _{1/2} FP9
	İnulin Nanopartikülü (mg)	350 mg	-
	Pektin Nanopartikülü (mg)	-	360 mg
	İnert pellet (mg)	4000 mg	4000 mg
Alt kaplama	Pharmacoat 606 (mg)	105 mg	105 mg
	PEG 6000 (mg)	26 mg	26 mg
Fonksiyonel kaplama	Eudragit L30D-55 (mg)	625 mg	625 mg
	PlasACRYL T20 (mg)	32 mg	32 mg
	Trietil sitrat (mg)	63 mg	63 mg

2.10.2.Kaplanmış Pelletlerde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

2.10.2.1.Partikül Büyüklüğü Tayini

Kaplanmış pelletlerin partikül boyutlarını ölçmek amacıyla Mastersizer 3000 (Malvern) cihazı kullanılmıştır. Partikül büyüklüğü ışık saçılımı yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Süspansiyon ortamı olarak su kullanılmış ve bulutlanma (obscuration) derecesi cihazda belirtildiği % 0,1-20 arasında tutularak 6 ölçüm yapılmıştır. Pelletlerin %10, 50 ve 90'ına karşılık gelen hacim ve yüzey çap ölçümleri ve span değerleri hesaplanmıştır (D90, D10, D50, D[3:2], D[4:3] ve span).

2.10.2.2.Zeta Potansiyeli Tayini

Kaplanmış pelletlerde zeta potansiyeli zetasizer cihazı ile tayin edilmiştir. Kaplanmış formülasyonlarda zeta potansiyeli ölçümü için pelletler distile suda disperse edildikten sonra zetasizer kuvvetlerine koyularak her bir numune için 6 ölçüm yapılmıştır.

2.10.2.3.Rekonstitüsyon Çalışmaları

Kaplama sonrası nanopartiküllerdeki değişikliği incelemek amacıyla rekonstitüsyon çalışmaları yapılmıştır. Nanopartiküllerle kaplanmış (alt kaplama) 10 mg pellet 20 ml distile suyun içerisinde atılmış ve ultrasonik banyoda 20 sn tutulmuştur. Daha sonra çökeltiyi ayırmak amacıyla filtre kağıdından (Whatman 42) süzölmüş ve süpernatandaki nanopartiküllerin boyutu zetasizer ile ölçülerek değişiklik olup olmadığı incelenmiştir.

2.10.2.4.Miktar Tayini Çalışmaları

Etkin madde yüklü nanopartiküllerle kaplandıktan sonra fonksiyonel kaplama uygulanan pelletlerde etkin madde miktar tayini için direkt yöntem tercih edilmiştir. Kaplanmış pelletlerden 5,0 mg tartılarak enterik kaplamayı parçalamak amacıyla 0,5 ml aseton ilave edilerek çeker ocak altında aseton uçurulmuştur. Daha sonra Bölüm 2.8.1’de anlatıldığı gibi nanopartiküllerde SAME miktarı tayin edilmiştir. Bu amaçla kalıntı üzerine 1 ml metanol eklenerek 5 dk inkübasyon ile polimerin parçalanması sağlanmıştır, ardından 5 ml’ye distile suyla tamamlanarak 30 dk ultrasonik banyoda tutulmuştur, böylece etkin maddenin suya geçişi sağlanmıştır. Polimerlerin uzaklaştırılması amacıyla 0,22 µm-membran filtreden süzülen numune UV spektrofotometrede etkin madde miktarının tayini amacıyla analiz edilmiştir; Eşitlik 7 yardımı ile % etkin madde içeriği (EMİ) hesaplanmıştır.

2.10.2.5.Etkin Madde Salımının Tayini

Kaplanmış pelletlerden etkin madde salım tayini çözünme testi cihazının mini kitleri kullanılarak döner palet yöntemi ile yapılmıştır. Salım çalışmalarına başlamadan 12 saat önce formülasyonların içine koyulacağı diyaliz membranlar (MW cut-off 12 000 Da) ultra saf su içine alınarak hidrate edilmiştir. Belirli miktarda SAME (≤ 2 mg) içeren pellet kütlesi tartılarak 0,5 ml SGF’de disperse edilerek diyaliz membran içine koyulmuştur. Diyaliz membranlar iki ucundan ağırlıklı klipsler kullanılarak kapatıldıktan sonra çözünme ortamına yerleştirilmiştir. Test 2 saat SGF ortamında yapıldıktan sonra, diyaliz membranlar SCoF2 ortamına taşınmış ve salım çalışmasına bu ortamda devam edilmiştir. Çalışma, 100 ml’lik çözünme ortamında, 37°C’de, 75 rpm karıştırma hızı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sırası ile 5., 10., 15., 30., 60., 90., 120., 180., 240., 360., 480. dakikalar ve 24. saatte numuneler alınmıştır. Alınan 3 ml numune yerine aynı miktar ortam sıvısından ilave edilerek ortam hacminin sabit kalması sağlanmıştır. Kaplama formülasyonlarının değerlendirilmesi ve uygun formülasyonun seçimi için çözünme hızı çalışmaları sonucunda elde edilen verilere

Weibull kinetiği uygulanarak etkin maddenin % 63,2'sinin çözünmesine/salımına karşılık gelen süre (τ_d) Eşitlik 9 kullanılarak hesaplanmıştır (Yüksel ve ark., 2000).

2.10.3.Pelletlerin Görüntülenmesi

SEM ile Görüntüleme Bölüm 2.9.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

2.10.4.Pelletlerde Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesi

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Etkin maddenin, pellet formülasyonlarındaki yardımcı maddelerin, formülasyondaki maddelerin fiziksel karışımlarının, pellet formüllerinin DSC termogramları Bölüm 2.9.1'de anlatıldığı şekilde alınarak maddeler arasındaki etkileşimler incelenmiştir (Çizelge 2.12).

Çizelge 2.12. Pellet formülasyonlarında etkin madde ve yardımcı madde etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla yapılan DSC analizi için hazırlanan numuneler.

	Pektin nanopartikülleri ile kaplanmış pelletler	İnülin nanopartikülleri ile kaplanmış pelletler
a	SAMe	SAMe
b	FP9 nanopartikülleri	FI18 nanopartikülleri
c	K ₂ FP9 pelletleri	K ₂ FI18 pelletleri
d	Pharmacoat 606	Pharmacoat 606
e	PEG 6000	PEG 6000
f	Fonksiyonel kaplama formülü	Fonksiyonel kaplama formülü
g	K ₂ FP9 pelletlerine ait bileşenlerin fiziksel karışım	K ₂ FI18 pelletlerine ait bileşenlerin fiziksel karışım
h	İnert pellet	İnert pellet

X Işını Toz Difraktometri (XRPD)

Etkin maddenin, pellet formülasyonlarındaki yardımcı maddelerin, formülasyondaki maddelerin fiziksel karışımlarının, pellet formüllerinin XRPD analizi Bölüm 2.9.1’de anlatıldığı şekilde yapılmıştır (Çizelge 2.13).

Çizelge 2.13. Pellet formülasyonlarında etkin madde ve yardımcı madde etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla yapılan XRPD analizi için hazırlanan numuneler.

	Pektin nanopartikülleri ile kaplanmış pelletler	İnülin nanopartikülleri ile kaplanmış pelletler
a	SAMe	SAMe
b	FP9 nanopartikülleri	FI18 nanopartikülleri
c	K ₂ FP9 pelletleri	K ₂ FI18 pelletleri
d	Alt kaplama bileşenlerinin fiziksel karışım	Alt kaplama bileşenlerinin fiziksel karışım
e	Fonksiyonel kaplama formülü	Fonksiyonel kaplama formülü
f	K ₂ FP9 pelletlerine ait bileşenlerin fiziksel karışım	K ₂ FI18 pelletlerine ait bileşenlerin fiziksel karışım
g	İnert pellet	İnert pellet

2.10.5.Kaplanmış Pelletlerde Stabilite Çalışmaları

Stabilite tayini için katı toz haldeki pelletler 5±3°C’de buzdolabında ve 25±2 °C, % 60±5 bağıl nemdeki iklim dolabında 6 ay boyunca tutulmuştur; 3. ve 6. ayların sonunda numuneler suda disperse edildikten sonra etkin madde miktar tayini, SS/RS yüzde oranları HPLC analizi ile) tayin edilmiştir.

2.11.SAMe Yüklü Formülasyonların İn Vivo Etkinliğinin İncelenmesi

İn vitro karakterizasyon çalışmaları sonrasında en uygun olduğu belirlenen FP9 ve FI18 formülasyonları ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kaplanmış formlarının in vivo performansı sıçanlarda incelenmiştir. Bu çalışma için ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU’ndan onay alınmıştır (Tarih: 25-02-2015; Karar No: 2015-3-65). Araştırmada 350-580 g ağırlığındaki sağlıklı erkek Wistar sıçanları rastgele seçilerek kullanılmıştır. Sıçanların

deney günü öncesi yemleri alınarak gece boyunca (10-12 saat) ve deney süresince aç kalmaları sağlanmış ve bu süre içinde sadece su tüketmelerine izin verilmiştir.

Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur (n=6):

Grup 1: SAME'nin sulu çözeltisinin oral yolla verilmesi (kontrol grubu)

Grup 2: SAME içeren inülin bazlı nanopartikül dispersiyonlarının oral yolla verilmesi

Grup 3: SAME içeren pektin bazlı nanopartikül dispersiyonlarının oral yolla verilmesi

Grup 4: SAME içeren inülin bazlı kaplanmış pelletlerin oral yolla verilmesi

Grup 5: SAME içeren pektin bazlı kaplanmış pelletlerin oral yolla verilmesi

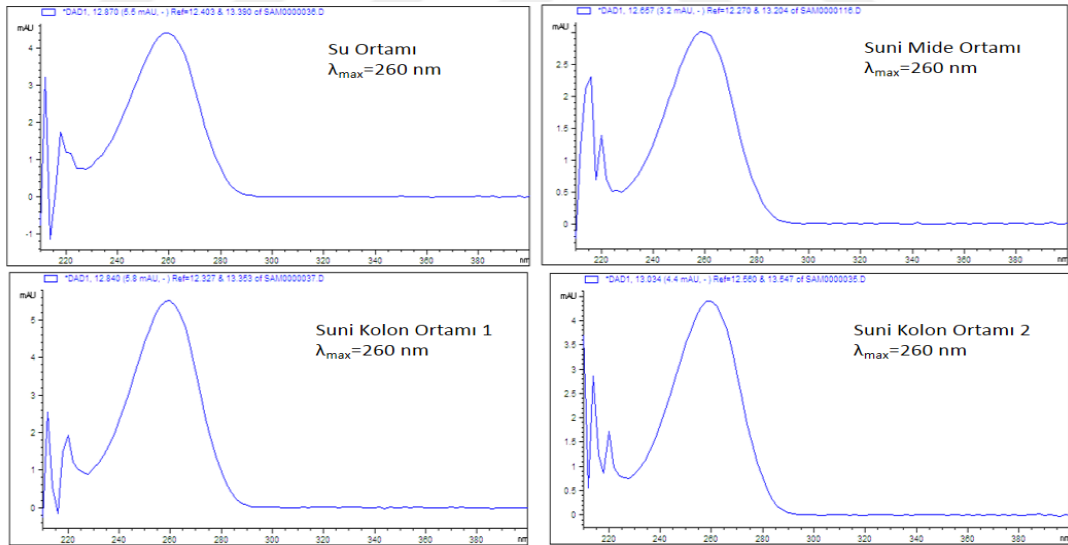
İn vivo olarak uygulanacak numune dispersiyonları şu şekilde hazırlanmıştır: Uygulama yapılacak hayvanın ağırlığına göre hesaplanan 1 mg/kg SAME dozuna karşılık gelen nanopartikül / kaplanmış nanopartikül kütlelerinin, hayvanlara verilmeden hemen önce 0,36-0,65 ml, % 0,45 a/h HPMC (viskozite 80–120 cP, %2'lik sulu çözeltisi), çözeltisi içerisinde, vortex ile karıştırılarak, sulu dispersiyonları hazırlanmıştır. Bu dispersiyonlar besleme tüpü (gavaj) ile oral olarak ratlara verilmiştir. Uygulamadan hemen önce ve uygulamadan sonra 0,25., 0,5., 1., 2., 4., 6., 8., 12., 24. saatlerde deney hayvanlarının kuyruk venlerinden 0,25 ml kan numuneleri önceden heparinlenmiş tüplerde toplanmıştır. Bu amaçla 24 saat içinde her bir deney hayvanından alınan toplam kan hacmi yaklaşık 2,5 ml olmuştur. Bu miktar literatür ve rehberlerdeki bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda kullandığımız sıçanların beden ağırlıklarına (350-580 g) göre toplam kan hacimlerinin (40-60 ml) yaklaşık % 10-15'ine karşılık gelmektedir ve farmakokinetik çalışmalar için kabul edilebilir sınırlar içindedir. Bununla birlikte deney sırasında yaşamsal fonksiyonları bozulacak olan sıçanlar çalışmadan hemen çıkarılmış ve gerekirse ötenazi yapılmıştır. Tüm numuneler 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir ve plazmalar alınarak analiz zamanına kadar -80°C'de saklanmıştır. Deney öncesi sıçanlardan alınan kan numunelerinde de ayrıca endojen SAME tayini yapılmıştır ve elde edilen bazal değerler sonraki zaman noktalarında ölçülen değerlerden düşülmüştür.

3. BULGULAR

3.1. SAME'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Geliştirilmesi

3.1.1.SAMe'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi

SAMe'nin sudaki çözeltisinin 200-400 nm aralığında HPLC'de alınan spektrumunda maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) 260 nm olarak bulunmuştur (Şekil 3.1). Aynı zamanda SAMe'nin çözünme ortamları olarak kullanılacak suni mide ortamı - SGF, suni kolonik ortam 1 – SCoF1 ve suni kolonik ortam 2 – SCoF2 içindeki çözeltilerinin de spektrumları alınmış ve $\lambda_{\max}$ değerlerinin değişmediği görülmüştür. Sonuç formülasyonlardan etkin madde salım hızı testlerinde HPLC'nin aynı koşullarda incelenebileceğini göstermek için yapılmıştır.



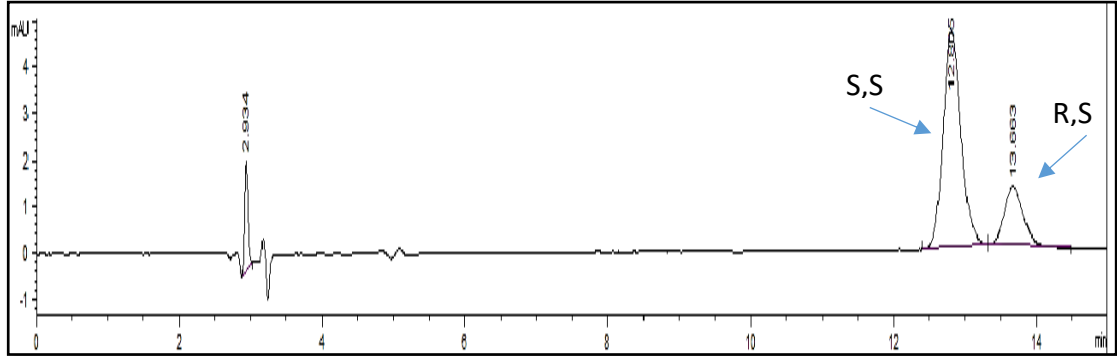
Şekil 3.1. SAMe'nin farklı ortamlardaki spektrumu.

3.1.2.SAMe'nin HPLC ile Su Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular

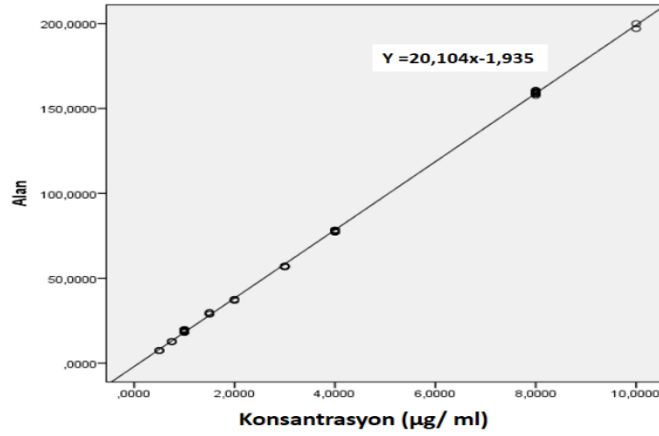
SAMe'nin S,S ve R,S diastereoizomerleri Çizelge 3.1'de verilen koşullar altında ayrılmıştır. Elde edilen HPLC kromatogramı ve standart doğru Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te verilmiştir. Uygulanan koşullar altında SAMe'nin iki izomerine ilişkin pikler ayrılmıştır.

Çizelge 3.1. SAMe'nin su ortamındaki HPLC ile miktar tayininde belirlenen koşullar.

Parametre	Bulgular
Sıcaklık	25 ± 2°C
Cihaz	Agilent 1260 Infinite
Kolon	C18 ters faz ;(250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Dalga Boyu	260 nm
Mobil faz	%1 TFA içeren Amonyum asetat tamponu (pH 5.4)
Akış hızı	1 ml/dak
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Alıkonma zamanı	12,81 / 13,67 (S,S/R,S) dk



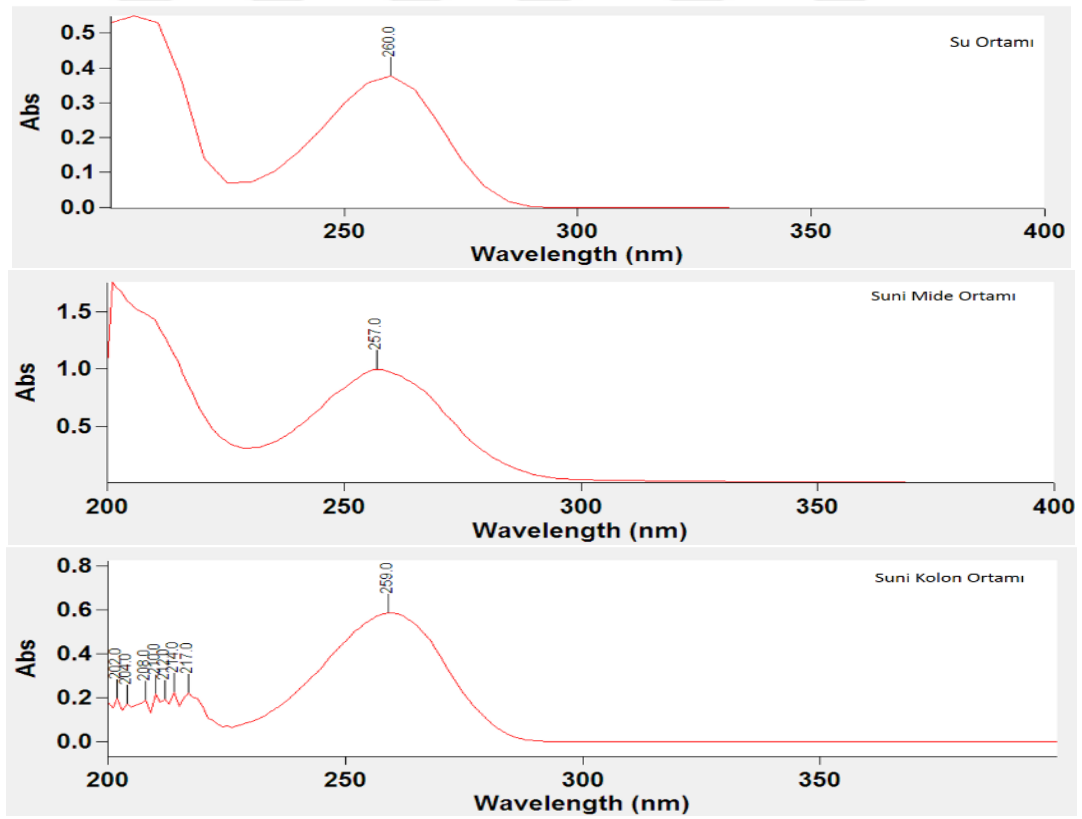
Şekil 3.2. Su ortamındaki SAMe S,S ve R,S pikini gösteren kromatogram.



Şekil 3.3. SAME'nin HPLC cihazında su ortamındaki standart doğrusu.

3.1.3.SAMe'nin Su, SGF ve SCoF2 Ortamlarında UV Spektrofotometrisi Analizi

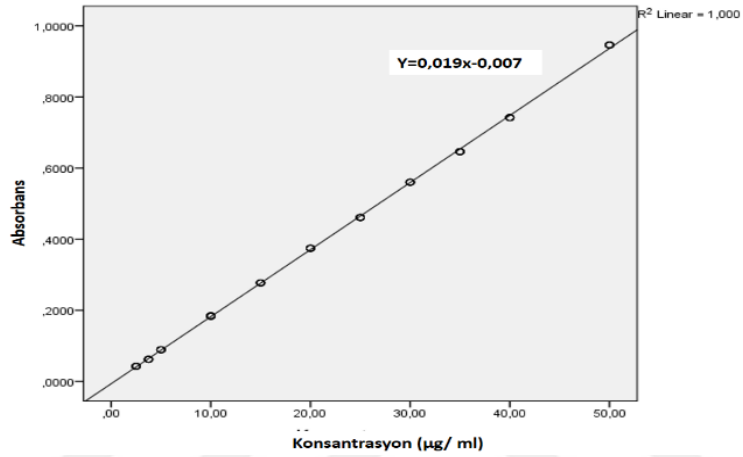
SAMe'nin farklı çözünme ortamlarındaki UV spektrumları Şekil 3.4'te görülmektedir.



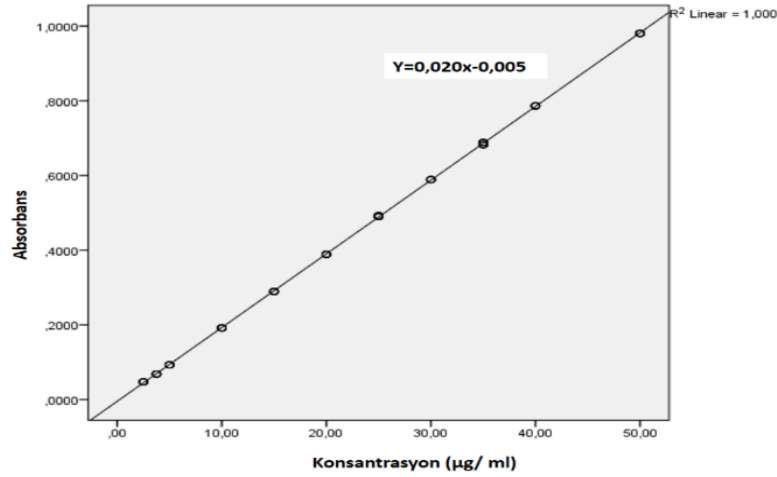
Şekil 3.4. SAMe'nin su, SGF ve SCoF2 ortamındaki spektrumları.

3.1.4.SAMe'nin UV Spektrofotometrisi ile Su, SGF ve SCoF Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular

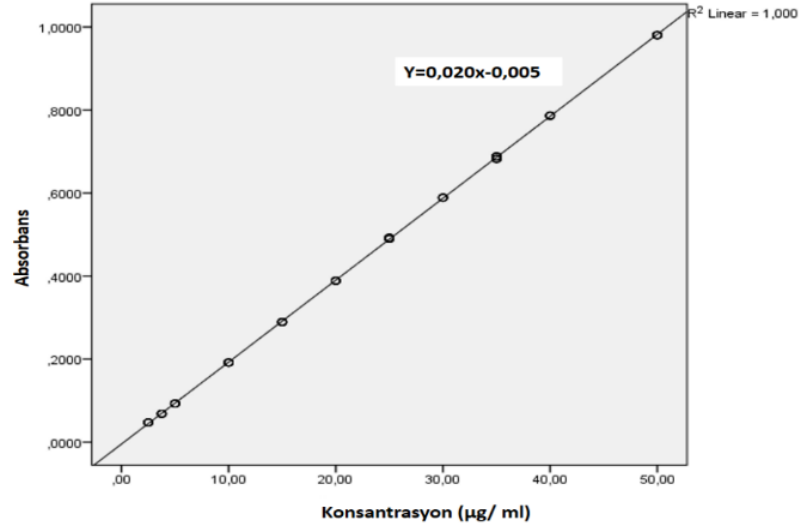
Bölüm 2.4.3'te belirtildiği gibi hazırlanan SAMe stok çözeltilerinden (50 µg/ml) hazırlanan seri SAMe çözeltilerinin, maksimum absorbans verdikleri dalga boylarında ($\lambda_{\text{max-su}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max-SGF}}=257 \text{ nm}$ ve $\lambda_{\text{max-SCoF2}}=259 \text{ nm}$) okunan absorbans değerlerinden herbir ortam için standart doğruları oluşturulmuştur (Şekil 3.5-3.7).



Şekil 3.5. SAMe'nin su ortamında UV Spektrofotometre ile elde edilen standart doğrusu.



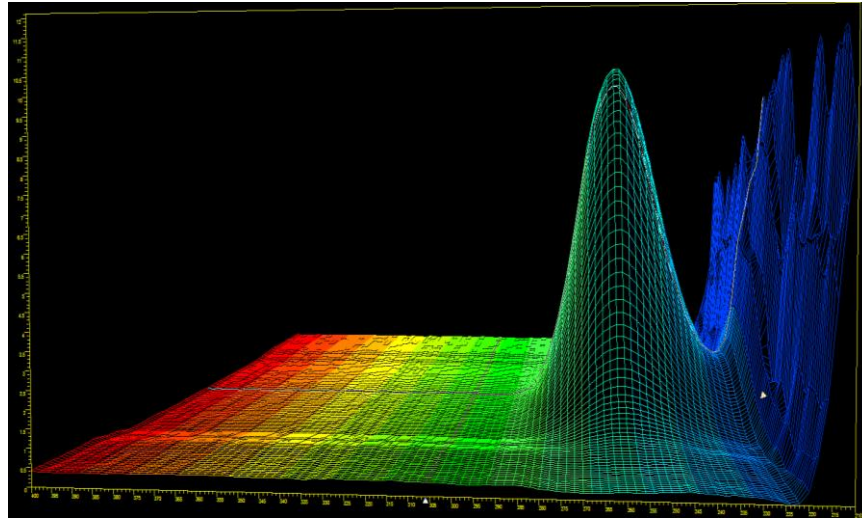
Şekil 3.6. SAMe'nin SGF'de UV Spektrofotometre ile elde edilen standart doğrusu.



Şekil 3.7. SAME'nin SCoF2'de UV Spektrofotometre ile elde edilen standart doğrusu.

3.1.5.SAMe'nin Plazma Ortamındaki HPLC Analizi

SAMe'nin HPLC analizinde plazma ortamda 200-400 nm aralığında alınan 3D spektrumunda, maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu $\lambda_{\text{max-su}} = 260 \text{ nm}$ olarak bulunmuştur (Şekil 3.8).



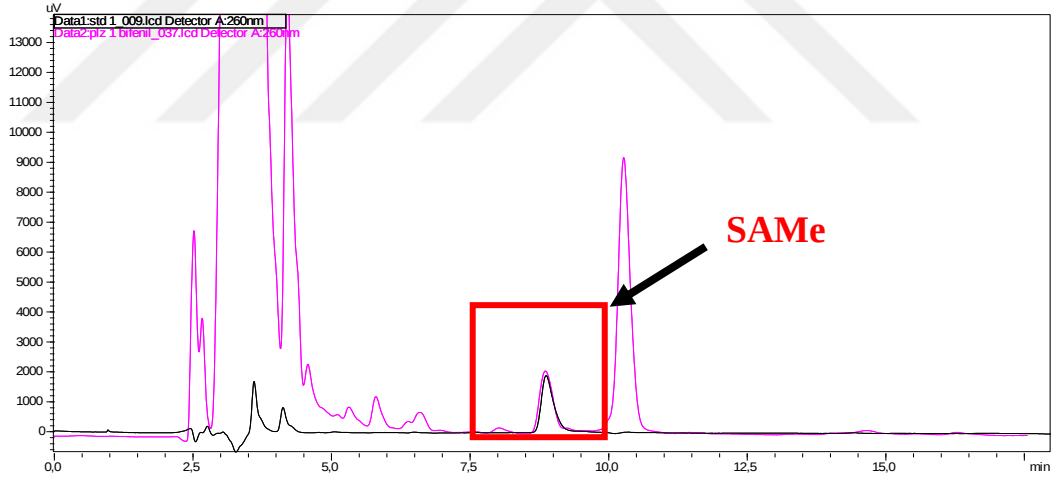
Şekil 3.8. SAMe'nin plazma ortamındaki spektrumu.

3.1.6.SAMe'nin HPLC ile Plazma Ortamındaki Standart Doğrularına İlişkin Bulgular

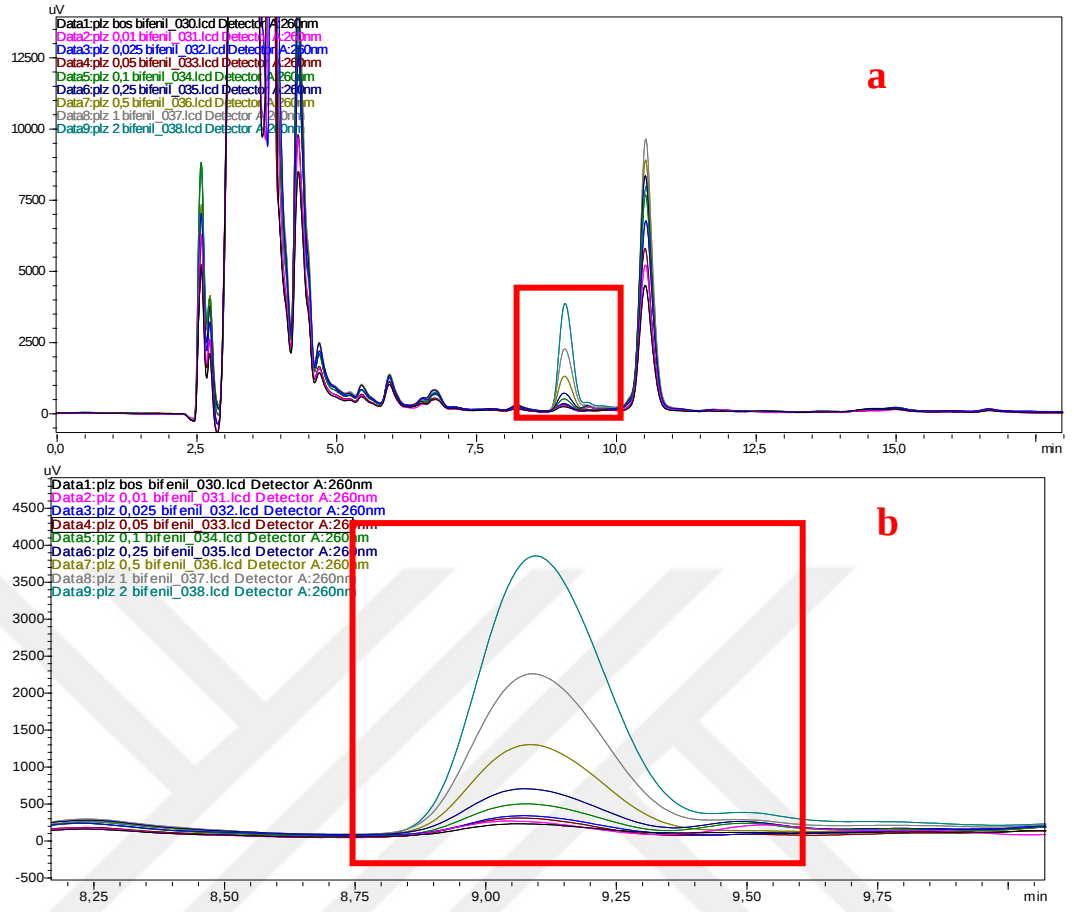
SAMe'nin plazma ortamında miktar tayini çalışmaları Çizelge 3.2'de verilen koşullar altında HPLC'de yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar ve standart doğru Şekil 3.9 – 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. SAMe'nin plazma ortamındaki HPLC ile miktar tayininde belirlenen koşullar.

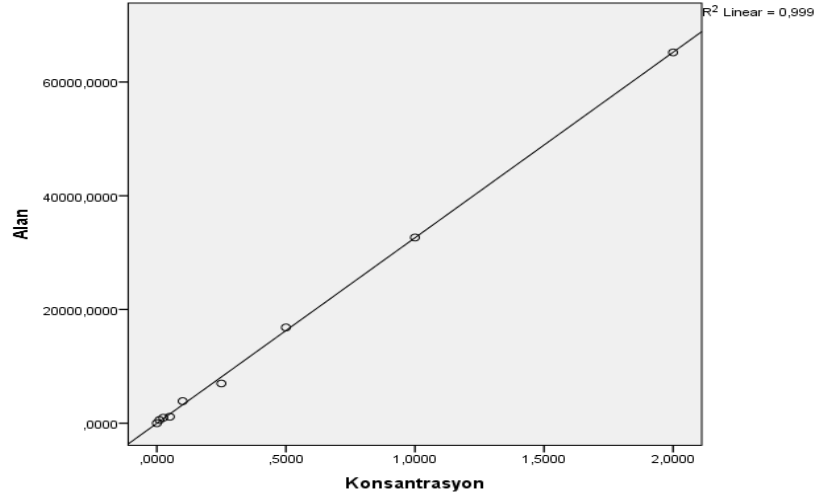
Parametre	Bulgular
Sıcaklık	25 ± 2 °C
Cihaz	Shimadzu (Prominence-LC2030C)
Kolon	Kinetex bifenil (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Dalga Boyu	260 nm
Mobil faz	%20 metanol içeren 10 mM Heptansülfonik asit sodyum tuzu, 50 mM Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 6)
Akış hızı	0,8 ml/dak
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Alınma zamanı	8,9 dk



Şekil 3.9. SAMe'nin 1 µg/ml konsantrasyonda su ortamında ve plazma ortamındaki kromatogramları (pembe:plazma, siyah: su).



Şekil 3.10. SAME'nin plazma ortamındaki standart doğrularının kromatogramları (a: genel görünüm, b: büyütülmüş görünüm).



Şekil 3.11. SAME'nin plazma ortamında HPLC ile elde edilen standart doğrusu.

3.2.SAMe'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonları

SAMe'nin Bölüm 2.5'te anlatıldığı şekilde yapılan analitik validasyon çalışmalarının bulguları aşağıda verilmektedir.

Doğrusallık ve Aralığı

SAMe'nin (S,S ve R,S diastereoizomerleri ayrılmaksızın) su ortamındaki miktar tayini için HPLC'de geliştirilen analitik yönteminin doğrusallık ve aralığı ile standart doğruya ait istatistiksel veriler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. SAMe'nin su ortamında HPLC ile miktar tayini yönteminin doğrusallık ve aralığı ile standart doğruya ait istatistiksel veriler.

SAMe (S,S + R,S)	
Doğrusallık ve Aralığı	2,5-10 µg/ml
Eğim	20,104
Eğimin %95 Güven Aralığı	Alt Sınır:20,012 Üst Sınır:20,195
Eğimin Önemlilik Değeri	< 0,001
Kesişim	-1,935
Kesişimin % 95 Güven Aralığı	Alt Sınır:-2,373 Üst Sınır:-1,496
Determinasyon Katsayısı	0,9997

SAMe'nin UV Spektrofotometrisi ile miktar tayini için su, SGF ve SCoF2 ortamlarında hazırlanan standart doğrularına ait doğrusallık ve aralığı ile istatistik verileri Çizelge 3.4'te yer almaktadır.

Çizelge 3.4. SAMe'nin su, SGF ve SCoF2 ortamındaki UV spektrofotometrik miktar tayini için geliştirilen analitik yönteminin doğrusallık ve aralığı ile standart doğruya ait istatistiksel veriler.

	Su Ortamı	SGF Ortamı	SCoF Ortamı
Doğrusallık ve Aralığı	2,5-50 µg/ml	2,5-50 µg/ml	2,5-50 µg/ml
Eğim	0,01887	0,02008	0,01974
Eğimi %95 Güven Aralığı	Alt Sınır:0,01878 Üst Sınır:0,01895	Alt Sınır:0,02002 Üst Sınır:0,02013	Alt Sınır:0,01970 Üst Sınır:0,01978
Eğimin Önemlilik Değeri	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Kesişim	-0,006690	-0,004610	-0,004746
Kesişimin % 95 Güven Aralığı	Alt Sınır: -0,008867 Üst Sınır: -0,004512	Alt Sınır:-0,006153 Üst Sınır:-0,003067	Alt Sınır:-0,005726 Üst Sınır:-0,003765
Determinasyon Katsayısı	0,9997	0,9998	0,9999

SAMe'nin plazma ortamındaki miktar tayini için HPLC'de geliştirilen analitik yönteminin doğrusallık ve aralığı ile standart doğruya ait istatistiksel veriler Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. SAMe'nin plazma ortamındaki miktar tayini için HPLC'de geliştirilen analitik yönteminin doğrusallık ve aralığı ile standart doğruya ait istatistiksel veriler.

SAMe (S,S + R,S)	
Doğrusallık ve Aralığı	0,01-2 µg/ml
Eğim	32632,533
Eğimi %95 Güven Aralığı	Alt Sınır:32027,593 Üst Sınır:33237,473
Eğimin Önemlilik Değeri	< 0,001
Kesişim	-21,224
Kesişimin % 95 Güven Aralığı	Alt Sınır:-486,575 Üst Sınır:444,127
Determinasyon Katsayısı	0,9994

Doğruluk

SAMe'nin su, SGF, SCoF2 ve plazma ortamlarında miktar tayinleri için geliştirilen spektrofotometrik yöntem ve HPLC yöntemlerinin doğruluğu için yapılan çalışmaların bulguları Çizelge 3.6'da verilmektedir.

Çizelge 3.6. Geliştirilen analitik yöntemlerin doğruluğunun incelenmesine ait veriler .

	Doğruluk			
	Konsantrasyon	Ortalama (%)	SS	% BSS
Spektrofotometri	5'er kez ölçüm			
Su ortamı	5 µg/ml	100,3	0,02304	0,02296
	20 µg/ml	100,3	0,02881	0,02871
	50 µg/ml	101,0	0,05760	0,05700
SGF	2,5 µg/ml	101	0	0
	30 µg/ml	99,13	0,01178	0,01188
	50 µg/ml	100,4	0,03290	0,03280
SCoF2	3,75 µg/ml	97,60	98,99	98,54
	30 µg/ml	0,1633	0,01394	0,01342
	50 µg/ml	0,1673	0,01408	0,01362
HPLC	5'er enjeksiyon			
Su ortamı	1 µg/ml	101,1	1,407	1,391
	4 µg/ml	99,70	0,2424	0,2431
	8 µg/ml	100,6	0,2043	0,2031
	5'er enjeksiyon			
Plazma ortamı	0,025 µg/ml	107,52	15,56	14,47
	0,25 µg/ml	85,02	1,582	1,861
	1 µg/ml	100,3	2,608	2,601

Kesinlik

Geliştirilen analitik yöntemlerin kesinliği Bölüm 2.5'te belirtildiği şekilde, tekrarlanabilirlik ve farklı günlerde, farklı analistler tarafından yapılan ara kesinlik çalışmaları olarak yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.7'de verilmektedir.

Çizelge 3.7. Geliştirilen analitik yöntemlerin kesinliğinin incelenmesine ait veriler.

	Kesinlik							
	Tekrarlanabilirlik			Ara kesinlik				
	<i>Konsantrasyon 10 kez ölçüm</i>			<i>Konsantrasyon 5 kez ölçüm</i>		<i>1. Gün</i>	<i>2. Gün</i>	<i>Farklı analist (1. Gün)</i>
Spektrofotometri								
Su ortamı	20 µg/ml	Ort (%)	100,3	20 µg/ml	Ort	20,05	20,15	20,33
		SS	0,068		SS	0,00686	0,01470	0,00440
		%BSS	0,068		%BSS	0,03420	0,07300	0,02160
SGF	35 µg/ml	Ort	98,62	25 µg/ml	Ort	24,20	24,76	24,86
		SS	0,4263		SS	0,01782	0,00447	0,00548
		%BSS	0,4323		%BSS	0,07364	0,01806	0,02204
SCoF2	40 µg/ml	Ort	100,2	35 µg/ml	Ort	34,79	35,48	-
		SS	0,03065		SS	0,01294	0,00447	-
		%BSS	0,03060		%BSS	0,03719	0,01260	-
HPLC	<i>12 enjeksiyon</i>			<i>12 enjeksiyon</i>				
Su ortamı	8 µg/ml	Ort	100,3	8 µg/ml	Ort	8,024	8,179	7,967
		SS	0,5434		SS	0,04347	0,03683	0,04012
		%BSS	0,5418		%BSS	0,5418	0,4503	0,5036
	<i>10 enjeksiyon</i>			<i>5 enjeksiyon</i>				
Plazma ortamı	1 µg/ml	Ort	97,9	1 µg/ml	Ort	1,00	0,961	-
		SS	0,027		SS	0,028	0,011	-
		%BSS	2,713		%BSS	2,837	1,212	-

Teşhis ve Tayin Sınırları

SAMe'nin spektrofotometrik ve HPLC analitik yöntemleri için belirlenen teşhis ve tayin sınırları Çizelge 3.8'de verilmektedir.

Çizelge 3.8. Geliştirilen analitik yöntemlerin SAMe teşhis ve tayin sınırları

	Teşhis sınırları (LOD) ng/ml	Tayin sınırları (LOQ) ng/ml
Spektrofotometri		
Su ortamı	635,5	1906
SGF	199,7	665,8
SCoF2	328,8	986,2
HPLC		
Su ortamı	25,85	86,16
Plazma ortamı	2,32	7,03

Sistem Uygunluk Testleri

HPLC yönteminde Bölüm 2.5'te belirtildiği şekilde yapılan SAME'nin S,S diastereoizomerinin su ortamındaki miktar tayininin uygunluk testleri sonuçları Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. HPLC 'de yapılan SAME'nin S,S diastereoizomerinin su ortamındaki miktar tayininin uygunluk testleri sonuçları.

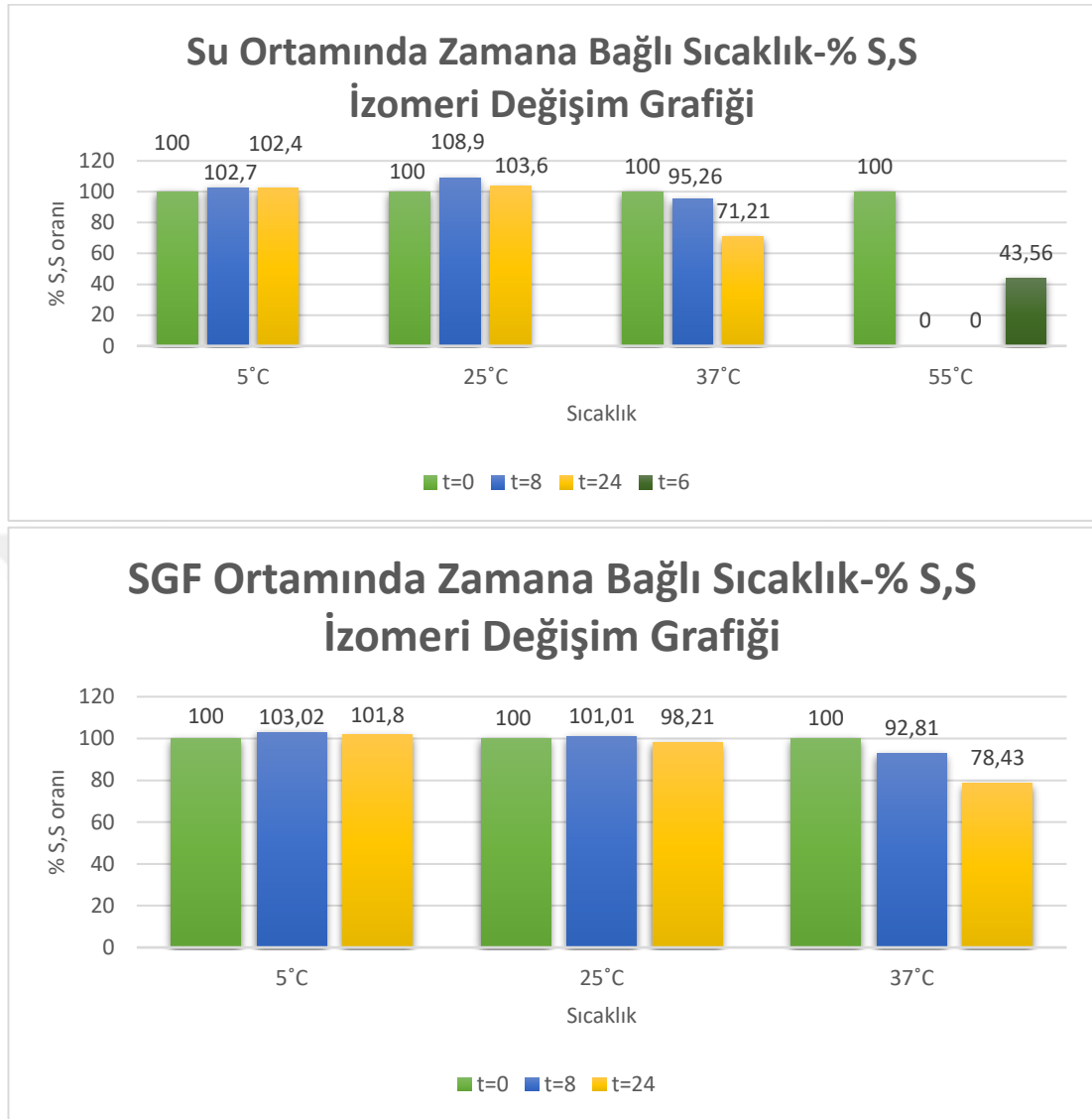
Enjeksiyon No	Alan	Alıkonma Zamanı (dk)	Kuyruklanma Faktörü (USP)	Teorik Plaka Sayısı (USP)
1	121,7	11,049	1,033	8587
2	121,0	11,035	1,000	12188
3	121,4	11,046	1,160	12012
4	120,8	11,068	1,160	12544
5	120,7	11,112	1,000	11837
6	120,5	11,134	1,000	12012
7	120,4	11,14	1,100	12012
8	119,7	11,153	1,000	12544
9	119,9	11,168	1,100	8709
10	119,7	11,158	1,000	12188
11	119,5	11,16	1,100	10367
12	118,9	11,183	1,100	8836
Ortalama	120,4	11,117	1,063	11153
SS	0,830	0,0500	0,063	1573,5
BSS (%)	0,690	0,4500	6,021	14,108

SAME Üzerinde HPLC ile Yapılan Stabilité Çalışmalarına Ait Bulgular

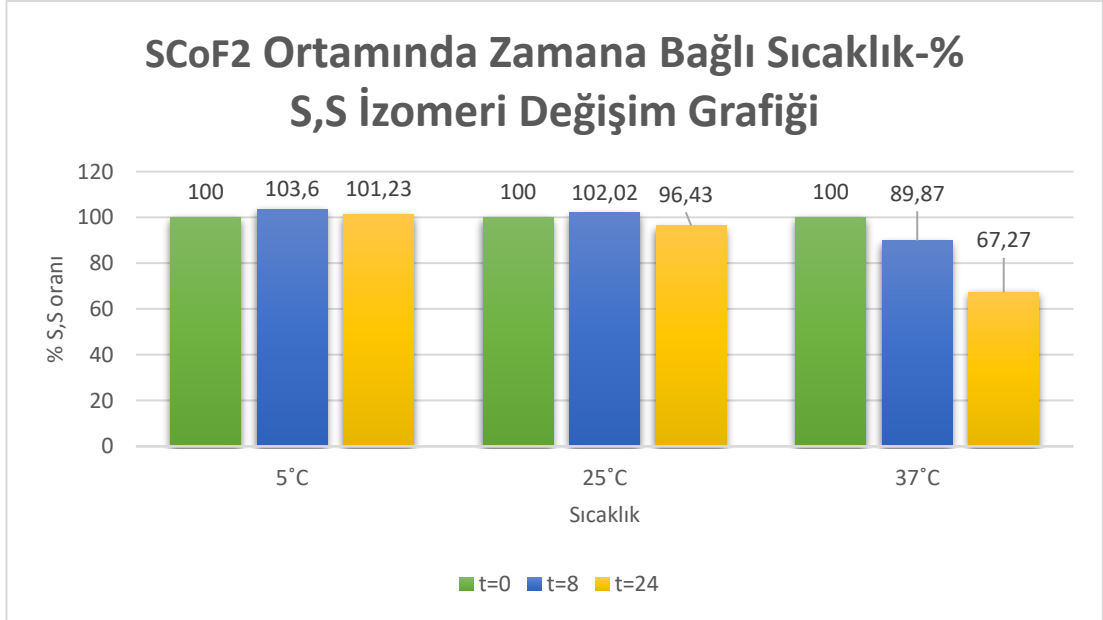
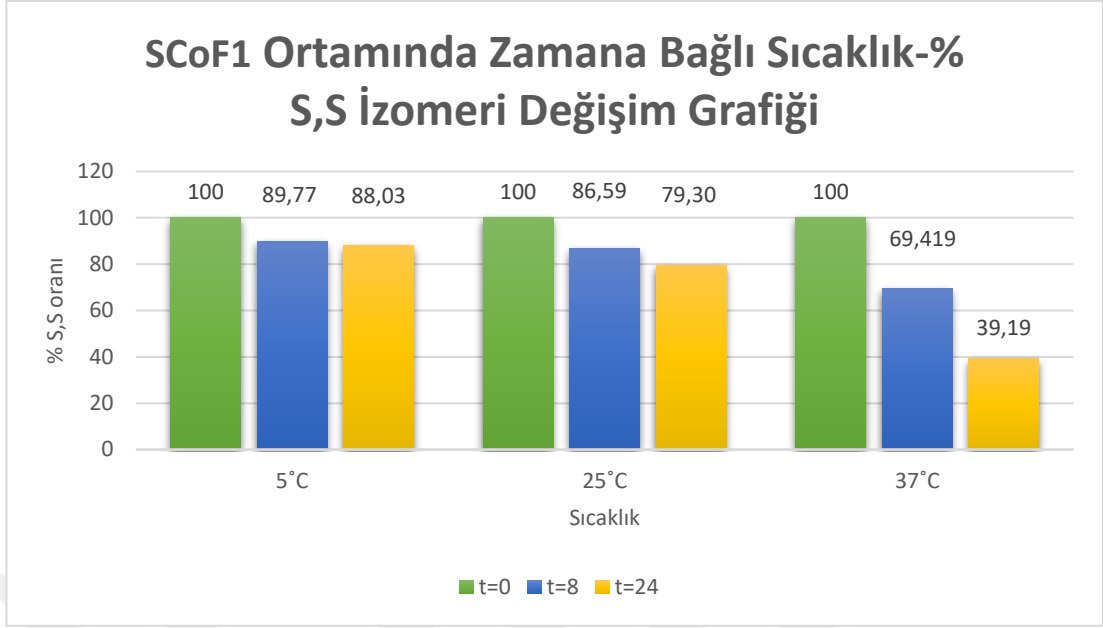
Stabilité çalışmaları Bölüm 2.5'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. HPLC yöntemiyle SAME'nin S,S/R,S diastereoizomerlerinin konsantrasyonları belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.10'da verilmiştir. SAME'nin aktif diastereoizomerik formu olan S,S diastereoizomerinin su, SGF, SCoF1 ve SCoF2 ortamlarında gözlenen konsantrasyon değişimleri ise Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.10. Stabilité çalışmalarında belirlenen S,S ve R,S diastereoizomer konsantrasyonları.

	Süre (saat)	5±3°C (S,S/R,S-µg/ml)	25 °C (S,S/R,S-µg/ml)	37°C (S,S/R,S-µg/ml)	55°C (S,S/R,S-µg/ml)
SU	t=0	3,784/1,096	3,784/1,096	3,784/1,096	3,784/1,096
	t=6	-	-	-	0,928/0,768
	t=8	3,685/1,055	3,653/1,097	3,258/1,212	
	t=24	3,706/1,074	3,464/1,116	2,223/1,187	



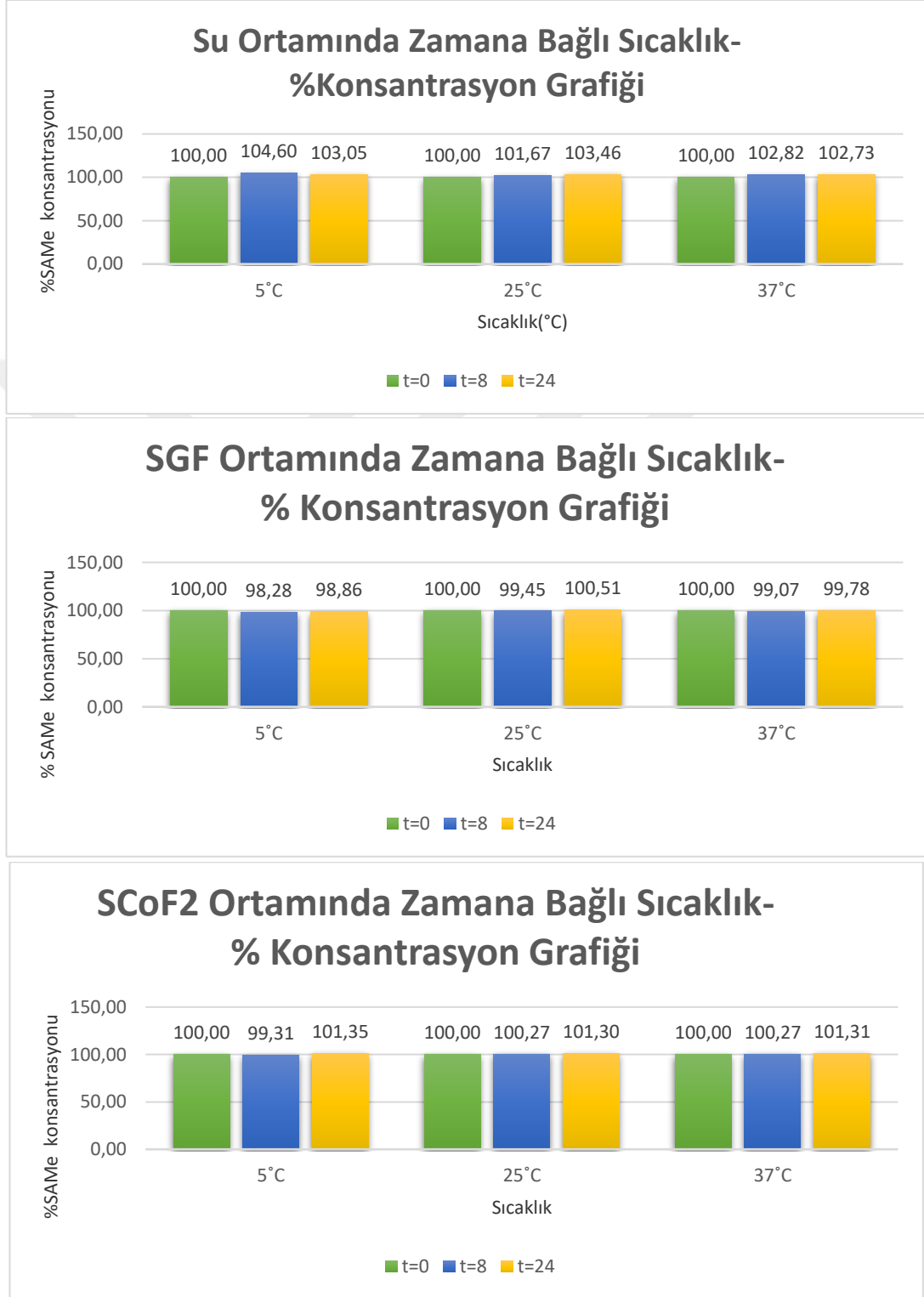
Şekil 3.12. Farklı ortam, sıcaklık ve sürelerde SAME'nin S,S diastereoizomerinin % değişimi.
 *55°C'de sadece 6. saatin sonundaki değişim incelenmiştir.



Şekil 3.12'nin devamı.

SAMe Üzerinde UV Spektrofotometrisi ile Yapılan Stabilité Çalışmalarına Ait Bulgular

Stabilité çalışmaları Bölüm 2.5'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.13'te verilmiştir.



Şekil.3.13. UV spektrofotometrisi ile farklı ortam, sıcaklık ve sürelerde SAME'nin % konsantrasyon değişim grafiği.

3.3.Etkin Maddenin Piyasa Preparatının Analizine Ait Bulgular

Çalışmada kullanılan etkin madde çözeltisi ile piyasa preparatının içerdikleri SAME'nin izomerbileşimi bakımından karşılaştırılması Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. SAME ve BIOSAME® karşılaştırması.

	Konsantrasyon	Alan (S,S)	Alan (R,S)	İzomer Oranı (S,S/R,S)
SAMe	5 µg/ml	74,90	21,80	3,436
BIOSAME®	5 µg/ml	64,70	58,10	1,114

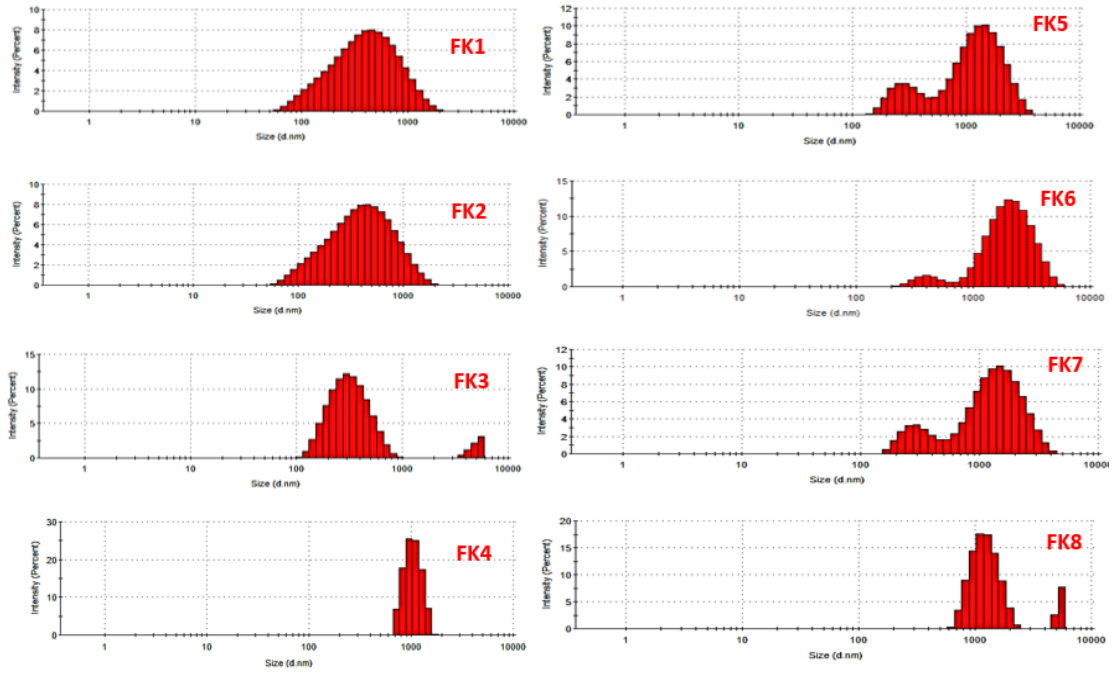
3.4.Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.4.1.Kitozan Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve Formülasyon Optimizasyonuna Ait Bulgular

Kitozan nanopartikülleri, Bölüm 2.7.1'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Nanopartikül formülasyonlarının in vitro karakterizasyonları Bölüm 2.8'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Formülasyon karakterizasyonuna ait sonuçlar Çizelge 3.12'de, partikül büyüklük dağılımları Şekil 3.14'te, formülasyon parametrelerinin partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, yükleme etkinliği ve işlem verimine etkisinin istatistik verileri Çizelge 3.13'te verilmektedir. Anlamlı ($p<0,05$) değişkenler Çizelgede (*) işaretlenmiştir. FK5 formülüne ait mikroskop görüntüleri de Şekil 3.15'te görülmektedir.

Çizelge 3.12. Kitozan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonuna ait bulgular.

Formül adı	Boyut $\pm$ SH (nm)	PDI	Zeta Potansiyel $\pm$ SH (mV)	% Yükleme etkinliği $\pm$ SH	% Verim
FK1	228,3 $\pm$ 5,875	0,439 $\pm$ 0,0245	14,10 $\pm$ 0,727	6,450 $\pm$ 1,400	31,70
FK2	363,0 $\pm$ 6,280	0,425 $\pm$ 0,018	20,20 $\pm$ 0,941	3,560 $\pm$ 0,280	30,60
FK3	429,6 $\pm$ 23,05	0,603 $\pm$ 0,048	17,70 $\pm$ 1,599	9,580 $\pm$ 1,995	35,90
FK4	389,9 $\pm$ 5,626	0,453 $\pm$ 0,056	15,20 $\pm$ 0,416	9,302 $\pm$ 0,840	34,60
FK5	763,9 $\pm$ 34,94	0,398 $\pm$ 0,046	18,40 $\pm$ 0,924	16,03 $\pm$ 0,780	11,06
FK6	268,8 $\pm$ 1,292	0,333 $\pm$ 0,023	23,30 $\pm$ 0,716	12,44 $\pm$ 0,370	13,70
FK7	484,8 $\pm$ 14,29	0,448 $\pm$ 0,003	16,90 $\pm$ 1,905	2,520 $\pm$ 1,199	20,16
FK8	351,2 $\pm$ 14,87	0,553 $\pm$ 0,014	15,40 $\pm$ 0,831	0,500 $\pm$ 0,302	24,14

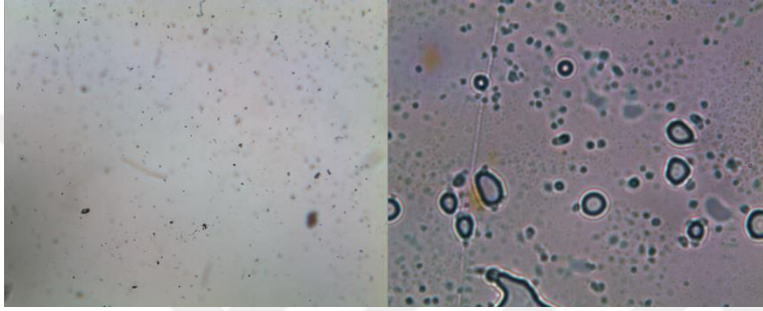


Şekil 3.14. FK1 - FK8 formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı.

Çizelge 3.13. Formülasyon parametrelerinin işlem sonuçlarına etkisinin istatistiksel verileri.

		Partikül Büyükliği	Zeta Potansiyel	Yükleme Etkinliği	İşlem Verimi
Kitozan miktarı	Katsayı	44,25	54,88	0,3196	-7,968
	P	0,579	0,108	0,065	-0,900
TPP miktarı	Katsayı	130,3	-45,76	-8,269	13,87
	P	0,426	-0,66	-0,420	0,390
SAmE miktarı	Katsayı	-9,083	-9,788	3,674	-1,756
	p	0,040*	-0,17	0,223	-0,060

*: $p < 0,05$: ilgili özellik üzerinde etkisi istatistiksel olarak önemli olan parametreler



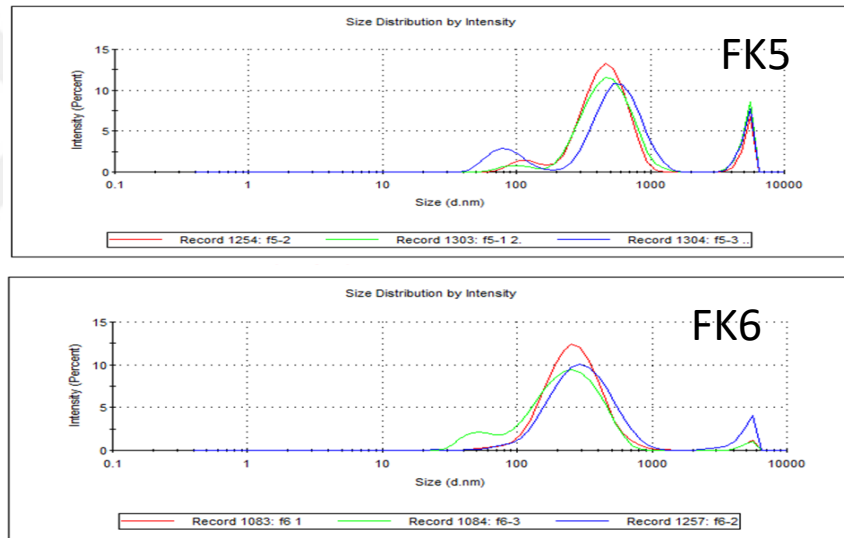
Şekil 3.15. Kitozan nanopartiküllerinin (FK5) ışık mikroskopundaki görüntüleri (Büyütme: x40, x100)

Kitozan Nanopartiküllerinin Üretiminin Tekrarlanabilirliğinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Kitozan nanopartiküllerinden yüksek yükleme etkinliği ve uygun partikül büyüklüğüne sahip en ideal iki formülasyon FK5 ve FK6 olmuştur. Bu formülasyonlar üçer kez hazırlanarak üretimin tekrarlanabilirliği değerlendirilmiştir. Hazırlanan formülasyonlara ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve yükleme etkinliği bulguları Çizelge 3.14'te ve Şekil 3.16'da verilmektedir.

Çizelge 3.14. FK5 ve FK6 formül serilerinin karakterizasyonuna ait bulgular.

Formül	Partikül büyüklüğü $\pm$ SH (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli $\pm$ SH (mV)	% Yükleme Etkinliği $\pm$ SH	%Etkin Madde İçeriği $\pm$ SH	% İşlem verimi
FK5-1	763,9 $\pm$ 34,94	0,595	18,4 $\pm$ 1,5	16,03 $\pm$ 0,7303	31,82 $\pm$ 1,449	11,06
FK5-2	750,1 $\pm$ 21,32	0,566	21,5 $\pm$ 4,38	12,63 $\pm$ 1,988	17,22 $\pm$ 2,711	16,09
FK5-3	752,6 $\pm$ 52,97	0,574	16,8 $\pm$ 0,751	13,23 $\pm$ 0,812	32,49 $\pm$ 1,994	8,94
%BSS	0,9732	2,590	12,64	13,00	31,75	30,53
F6-1	268,8 $\pm$ 1,3	0,337	23,3	12,40 $\pm$ 4,376	7,758 $\pm$ 2,738	13,70
F6-2	322,4 $\pm$ 4,45	0,502	20,6	7,712 $\pm$ 0,763	1,735 $\pm$ 0,1718	26,66
F6-3	229,9 $\pm$ 19,405	0,436	18,0	9,235 $\pm$ 1,01	2,976 $\pm$ 0,3256	38,10
%BSS	16,97	19,54	12,84	20,69	76,52	46,68



Şekil 3.16. FK5 ve FK6 formüllerinin partikül büyüklük ve dağılımı.

3.4.2. Pektin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Optimizasyonuna Ait Bulgular

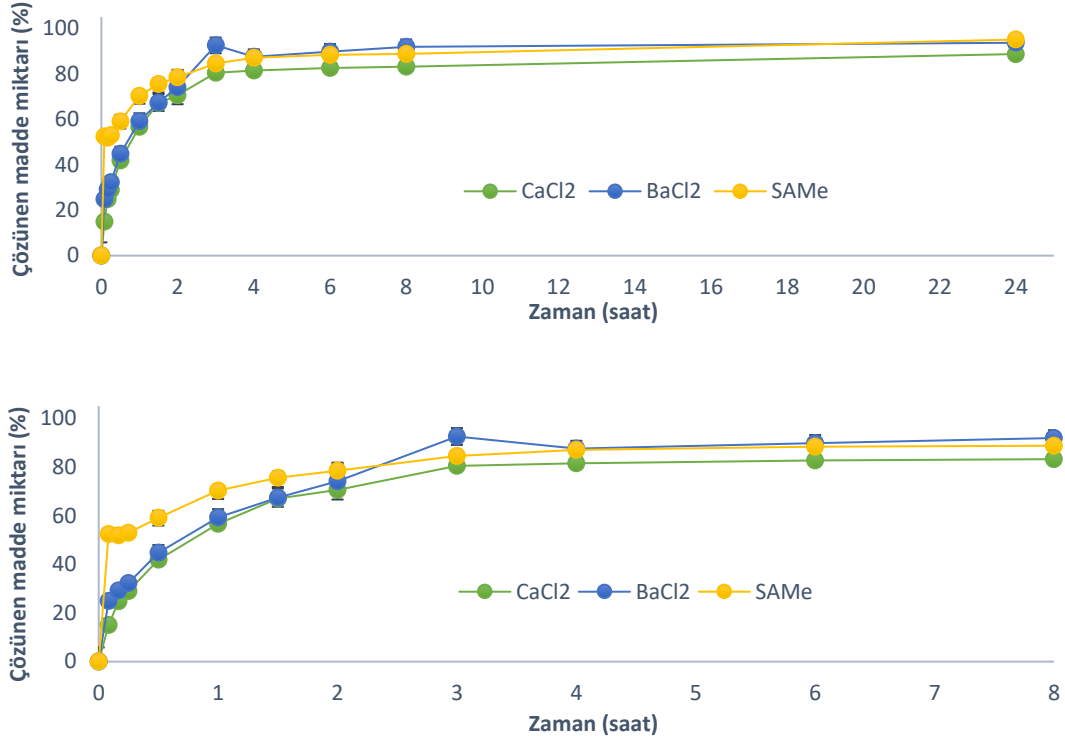
Bölüm 2.7.2’de anlatıldığı şekilde üçer seri halinde farklı çapraz bağlayıcılar kullanılarak hazırlanan pektin nanopartiküllerinin (FP1-FP4 formülasyonları) karakterizasyonları Çizelge 3.15’te verilmektedir.

Çizelge 3.15. Farklı çapraz bağlayıcılarla üretilen pektin nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonuna ait bulgular.

Formül	Çapraz Bağlayıcı	Partikül büyüklüğü $\pm$ SH	PDI $\pm$ SH	Zeta Potansiyeli $\pm$ SH	%Yükleme etkinliği $\pm$ SH	%Etkin Madde İçeriği $\pm$ SH	%İşlem Verimi
FP1- 1	MgCl ₂	654,8 $\pm$ 12,94	0,600 $\pm$ 0,0318	-20,6 $\pm$ 1,305	96,20*	10,70*	9,67
FP1- 2	MgCl ₂	767,8 $\pm$ 36,06	0,610 $\pm$ 0,0202	-20,6 $\pm$ 0,663	108,5*	12,06*	9,80
FP1- 3	MgCl ₂	775,1 $\pm$ 25,47	0,612 $\pm$ 0,0294	-20,5 $\pm$ 0,551	107,5*	11,95*	9,10
FP2- 1	MgSO ₄	606,2 $\pm$ 18,41	0,640 $\pm$ 0,018	-24,6 $\pm$ 0,779	99,61*	11,08*	5,23
FP2- 2	MgSO ₄	497,2 $\pm$ 18,40	0,649 $\pm$ 0,0155	-22,5 $\pm$ 0,548	105,6*	11,75*	5,48
FP2- 3	MgSO ₄	454,2 $\pm$ 4,062	0,411 $\pm$ 0,0138	-23,4 $\pm$ 0,433	96,38*	10,72*	5,09
FP3- 1	CaCl ₂ .2H ₂ O	685,2 $\pm$ 31,68	0,652 $\pm$ 0,09	-19,9 $\pm$ 1,386	71,44 $\pm$ 5,558	7,944 $\pm$ 0,6181	30,64
FP3- 2	CaCl ₂ .2H ₂ O	706,0 $\pm$ 62,95	0,693 $\pm$ 0,033	-21,6 $\pm$ 0,264	63,96 $\pm$ 1,511	7,112 $\pm$ 0,1681	29,16
FP3- 3	CaCl ₂ .2H ₂ O	469,1 $\pm$ 62,34	0,546 $\pm$ 0,033	-19,5 $\pm$ 0,032	72,96 $\pm$ 1,873	8,113 $\pm$ 1,872	31,35
FP4- 1	BaCl ₂	431,0 $\pm$ 65,02	0,543 $\pm$ 0,053	-20,9 $\pm$ 1,379	52,92 $\pm$ 1,986	5,885 $\pm$ 0,2208	58,32
FP4- 2	BaCl ₂	394,3 $\pm$ 48,61	0,595 $\pm$ 0,058	-22,4 $\pm$ 0,841	46,51 $\pm$ 4,247	5,172 $\pm$ 0,4723	58,65
FP4- 3	BaCl ₂	411,3 $\pm$ 38,13	0,535 $\pm$ 0,0205	-23,5 $\pm$ 0,405	50,60 $\pm$ 0,616	5,626 $\pm$ 0,0685	56,26

*:İşlem verimleri düşük olduğu için paralel deney yapılamamış ve SH değerleri verilememiştir.

Çapraz bağlayıcı seçmek amacıyla en yüksek verime sahip BaCl₂ ve CaCl₂ çapraz bağlayıcılarını içeren FP3 ve FP4 formülasyonları ile hazırlanan pektin nanopartiküllerinden Bölüm 2.8.5’te anlatıldığı şekilde etkin madde salım hızı çalışmaları yapılmıştır (Şekil 3.17) .



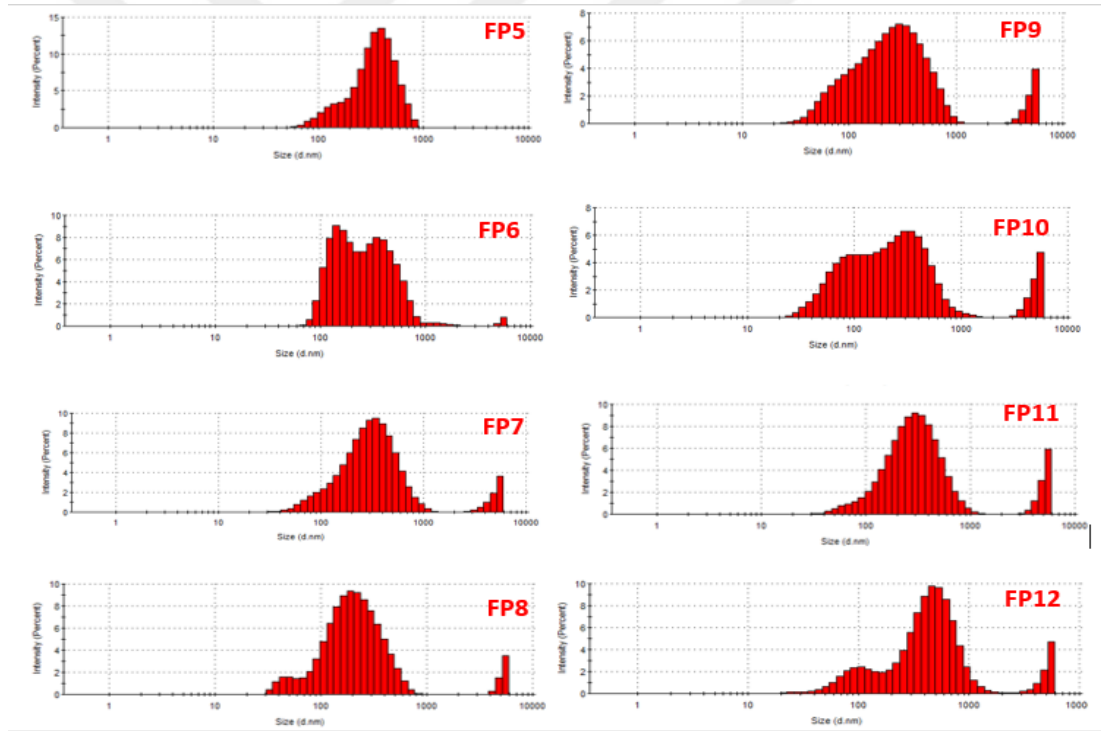
Şekil 3.17. BaCl₂ ve CaCl₂ çapraz bağlayıcı pektin nanopartiküllerinden etkin maddenin salım profilleri (üstteki salım profilleri 24 saatlik salımı, alttaki salım profilleri ise ilk 8 saatlik salımı göstermektedir).

Formülasyonların karakterizasyonundan sonra çapraz bağlayıcı olarak BaCl₂ ile formülasyonların geliştirilme çalışmaları devam etmiştir (FP5-F12). Bu formülasyonlara ilişkin karakterizasyon çalışmalarının bulguları Çizelge 3.16’da ve partikül büyüklük dağılımları Şekil 3.18’de görülmektedir. Bu formüllerle hazırlanan nanopartiküllerden etkin madde salım profilleri Şekil 3.19’da verilmektedir. Bölüm 2.8.5’te yer alan Weibull eşitliği ile etkin maddenin % 63.2’sinin çözünmesi için geçen süreler (τ_d) hesaplanmıştır.

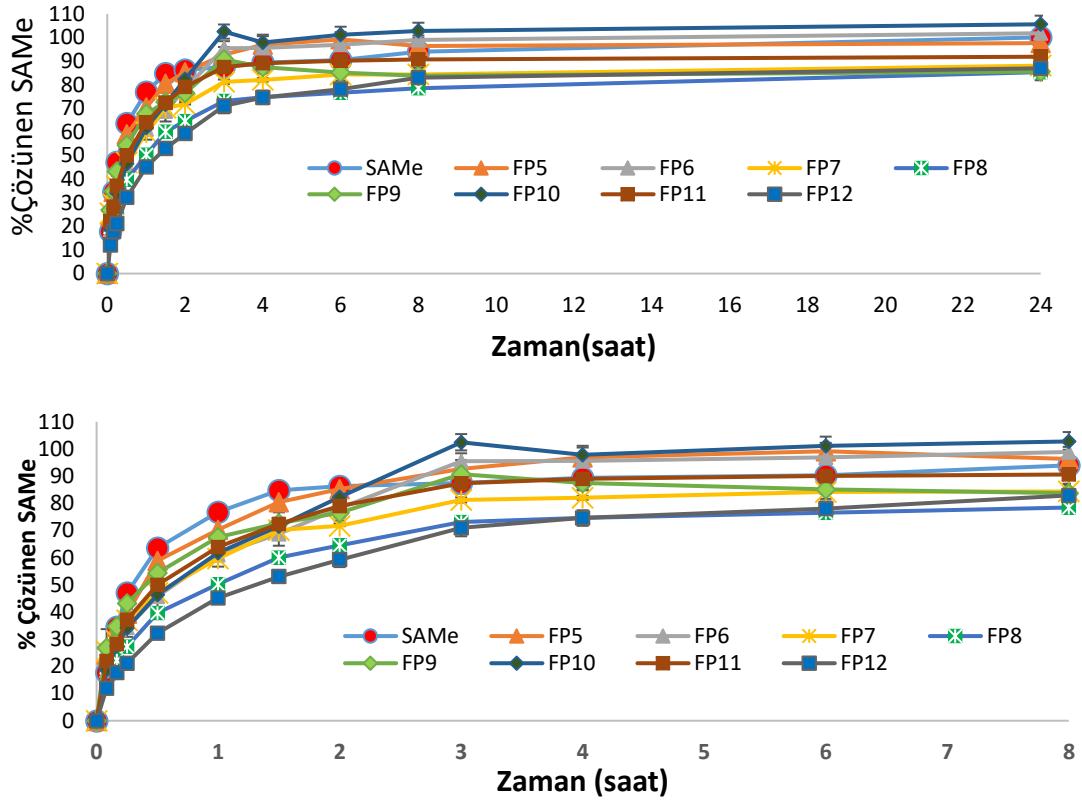
Çizelge 3.16. Çapraz bağlayıcı olarak BaCl₂ ile hazırlanan formülasyonların karakterizasyonuna ait bulgular.

Formül No	Partikül büyüklüğü $\pm$ SH (nm)	PDI $\pm$ SH	Zeta Potansiyeli $\pm$ SH (mV)	% Yükleme etkinliği $\pm$ SH	%Etkin Madde içeriği $\pm$ SH	% İşlem verimi	τ_d (dk)
FP5	552,7 $\pm$ 19,45	0,580 $\pm$ 0,0321	-25,5 $\pm$ 0,218	50,05 $\pm$ 2,568	10,01 $\pm$ 0,5135	59,07	41,36
FP6	374,4 $\pm$ 31,50	0,555 $\pm$ 0,0212	-24,9 $\pm$ 0,548	45,58 $\pm$ 5,047	5,068 $\pm$ 0,5612	67,19	40,49
FP7	363,4 $\pm$ 24,05	0,511 $\pm$ 0,0359	-13,3 $\pm$ 0,618	46,74 $\pm$ 3,000	7,375 $\pm$ 0,4734	47,37	88,09
FP8	203,7 $\pm$ 7,508	0,463 $\pm$ 0,0200	-10,9 $\pm$ 2,494	42,55 $\pm$ 3,046	3,647 $\pm$ 0,2611	67,09	155,0
FP9	301,5 $\pm$ 20,31	0,517 $\pm$ 0,0228	-16,3 $\pm$ 1,715	74,80 $\pm$ 3,745	9,783 $\pm$ 0,4885	69,61	56,55
FP10	328,3 $\pm$ 25,61	0,461 $\pm$ 0,0343	-13,0 $\pm$ 0,208	65,79 $\pm$ 3,913	4,590 $\pm$ 0,2729	70,70	62,35
FP11	399,5 $\pm$ 14,03	0,455 $\pm$ 0,0461	-17,3 $\pm$ 1,778	55,97 $\pm$ 4,303	6,224 $\pm$ 0,4785	61,81	68,71
FP12	454,3 $\pm$ 8,761	0,560 $\pm$ 0,0204	-20,1 $\pm$ 1,287	62,83 $\pm$ 1,818	3,696 $\pm$ 0,1070	66,31	178,6

*Saf SAME çözünme testinde hesaplanan τ_d değeri 45.77 dk'dır.



Şekil 3.18. FP5-FP12 formülasyonları ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımı.



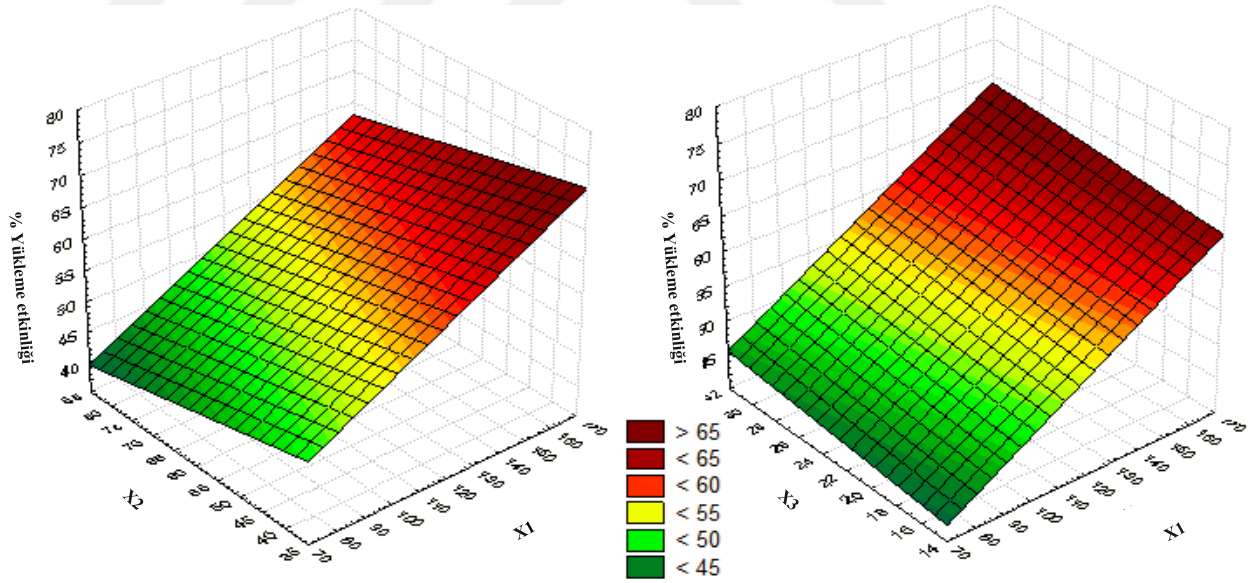
Şekil 3.19. Optimizasyon için hazırlanan pektin nanopartiküllerinden etkin maddenin salım profilleri (üst profiller 24 saatlik salımı, alt profiller ilk 8 saatlik salımı göstermektedir).

FP5-FP12 formülasyonlarında pektin, çapraz bağlayıcı $BaCl_2$, ve SAmE miktarları bağımsız değişkenler ve ölçülen cevaplar Çizelge 3.16'daki bulgular olmak üzere formülasyonların optimizasyonu için iki düzey – üç faktörlü (2^3) bir tasarım yapılmış ve çoklu lineer regresyon (MLR) ile değerlendirilmiştir. Bu istatistik değerlendirmenin sonuçları Çizelge 3.17'de verilmiştir. Şekil 3.20-3.22'de ise önemli bulunan faktörlerle nanopartiküllerin özelliklerinin cevap-yüzey değişimi gösterilmektedir.

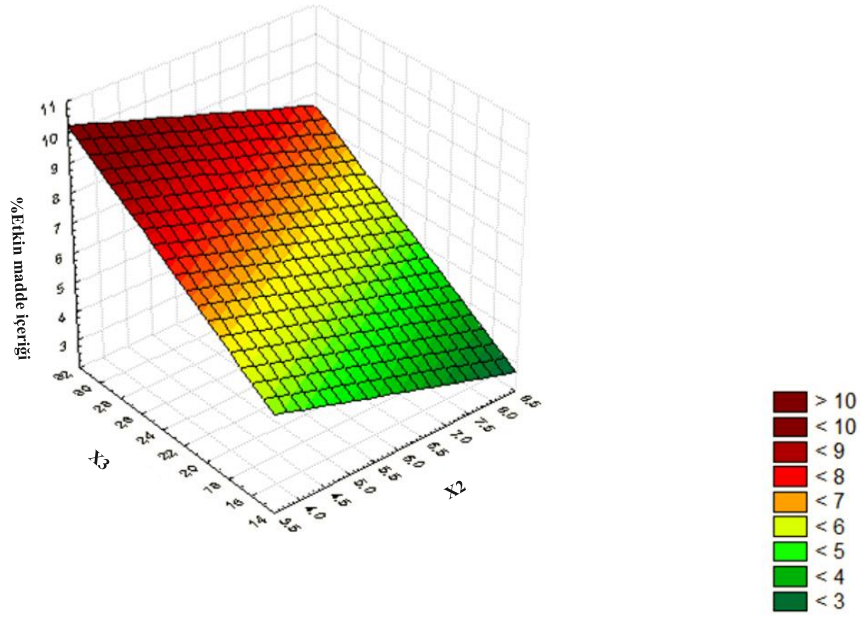
Çizelge 3.17. MLR analizinin sonuçları ve varyans analizinden (ANOVA) elde edilen P değerleri.

Bağımsız faktörler (ölçülen cevaplar)		(Pektin miktarı) X_1	(BaCl ₂ miktarı) X_2	(SAME miktarı) X_3	Intercept	R
Partikül Büyüklüğü	Katsayı	-0,6625	-8,5	4,273	331,1	0,3737
	P	0,9779	0,725	0,5160	0,2372	
Zeta Potansiyel	Katsayı	0,4938	1,1313	-0,0583	-26,1	0,4914
	P	0,6797	0,3661	0,8535	0,0906	
PDI	Katsayı	-0,0073	-0,0078	0,0004	0,5938	0,4643
	P	0,5173	0,4907	0,8904	0,005367*	
%Yükleme Etkinliği	Katsayı	4,6544	-1,7581	0,1802	34,11	0,9442
	P	0,0060*	0,1151	0,4834	0,0212*	
%Etkin Madde İçeriği	Katsayı	-0,1129	-0,5318	0,2732	4,021	0,9746
	P	0,4447	0,016293*	0,001544*	0,0464*	
%İşlem verimi	Katsayı	1,7319	-1,4994	-0,5572	74,79	0,8704
	P	0,1195	0,1625	0,0758	0,001288*	
τ_d	Katsayı	2,5779	18,099	-3,0279	30,45	0,8804
	P	0,6794	0,0354*	0,1216	0,6455	

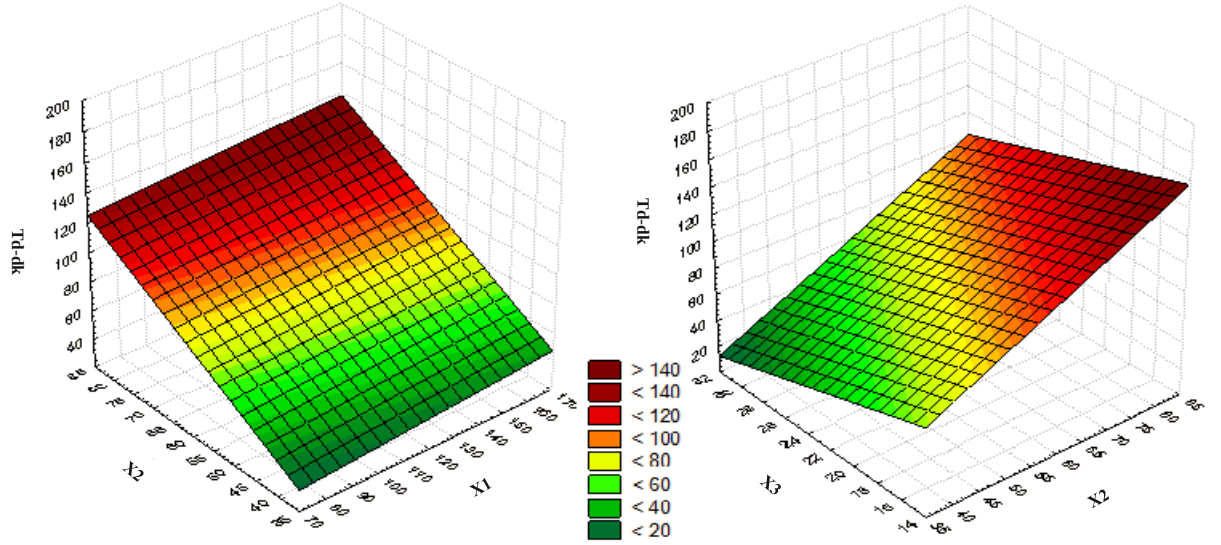
* $p < 0,05$



Şekil 3.20. Pektin (X_1) - BaCl₂ (X_2) miktarları (soldaki grafik) ve pektin (X_1) - SAME (X_3) miktarları ile (sağdaki grafik) nanopartiküllerin etkin madde yükleme etkinliğinin değişimini gösteren yüzey grafiği.



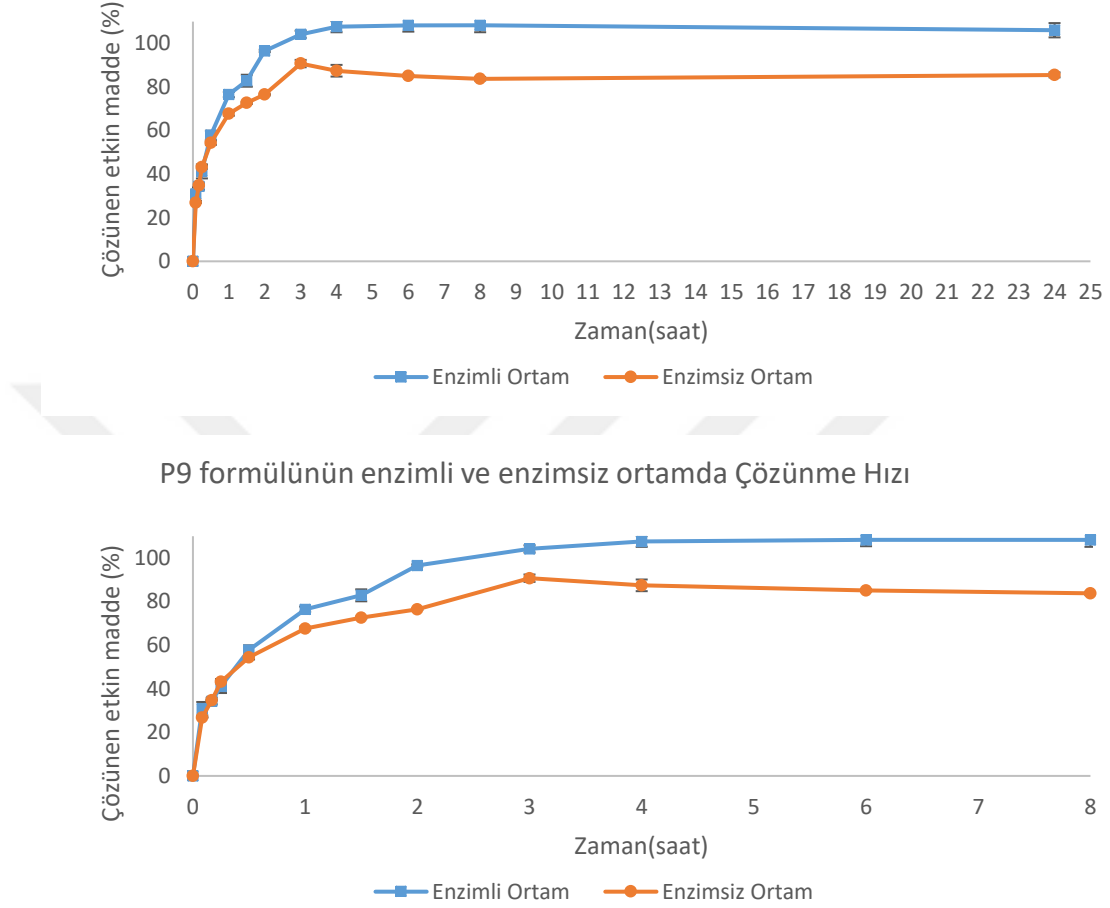
Şekil 3.21. BaCl₂ (X₂) ve SAME (X₃) miktarları ile nanopartiküllerin etkin madde içeriğinin değişimini gösteren yüzey grafiği.



Şekil 3.22. BaCl₂ (X₂) – pektin (X₁) miktarları (soldaki grafik) ve BaCl₂ (X₂) - SAME (X₃) miktarları ile (sağdaki grafik) nanopartiküllerin τ_d zamanının değişimini gösteren yüzey grafiği.

Yapılan bu çalışmaların sonucunda FP9 formülünün en optimum formül olduğuna karar verilmiş ve bu formülden SAME salımı üzerine enzim etkisinin incelenmesi için SGF'ye pepsin ve SCoF2'ye pektinaz ilave edilerek FP9 formülasyonundan etkin madde salım testi yapılmıştır (Şekil 3.23). Salım profilleri f_2

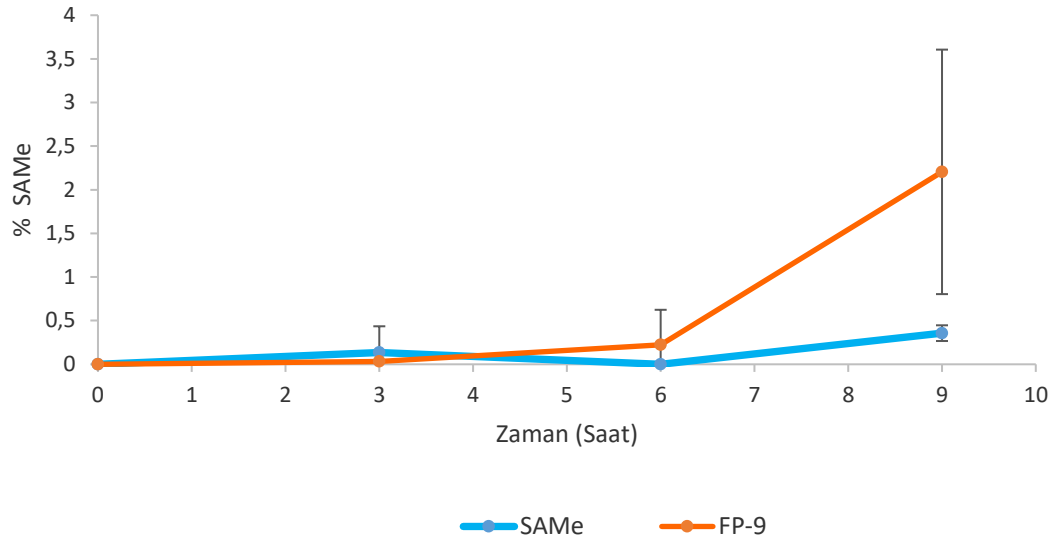
– benzerlik faktörü ile karşılaştırıldığında profillerin farklı olduğu anlaşılmıştır ($f_2 = 41,72$).



Şekil 3.23. Enzimli ve enzim içermeyen ortamlarda, FP9 formülasyonu ile hazırlanan pektin nanopartiküllerinden etkin maddenin salım profilleri (üst profiller 24 saatlik salımı, alt profiller ilk 8 saatlik salımı göstermektedir).

Yapay Membran (PAMPA) Modeli Kullanılarak Pektin Nanopartiküllerden SAME Permeabilitesinin Tayini

Pektin nanopartiküllerinden etkin maddenin in vitro permeabilitesi Bölüm 2.8.6’da anlatıldığı şekilde yapay membran modeli (PAMPA) ile belirlenmiş ve Şekil 3.24 ve Çizelge 3.18’de verilmiştir.



Şekil 3.24. SAME'nin yapay membranlardan permeasyonu üzerinde pektin nanopartikül formülasyonunun etkisi.

Çizelge 3.18. Pektin nanopartiküllerinden PAMPA ile elde edilen permeabilite bulguları.

	Permeabilite katsayısı (cm/saat)
Saf SAME*	131×10^{-6}
FP9**	3616×10^{-6}

*Tüm noktalar alınarak hesaplandı.

**Son üç nokta alınarak hesaplandı.

3.4.3. İnülin Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Optimizasyonuna Ait Bulgular

Çizelge 2.5'te yer alan formülasyonlarla inülin nanopartikülleri Bölüm 2.7.3'te belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Başlangıç formülasyonların karakterizasyon sonuçları Çizelge 3.19'da verilmiştir.

Çizelge 3.19. İnülin nanopartikül ön formülasyonlarının karakterizasyonuna ait bulgular.

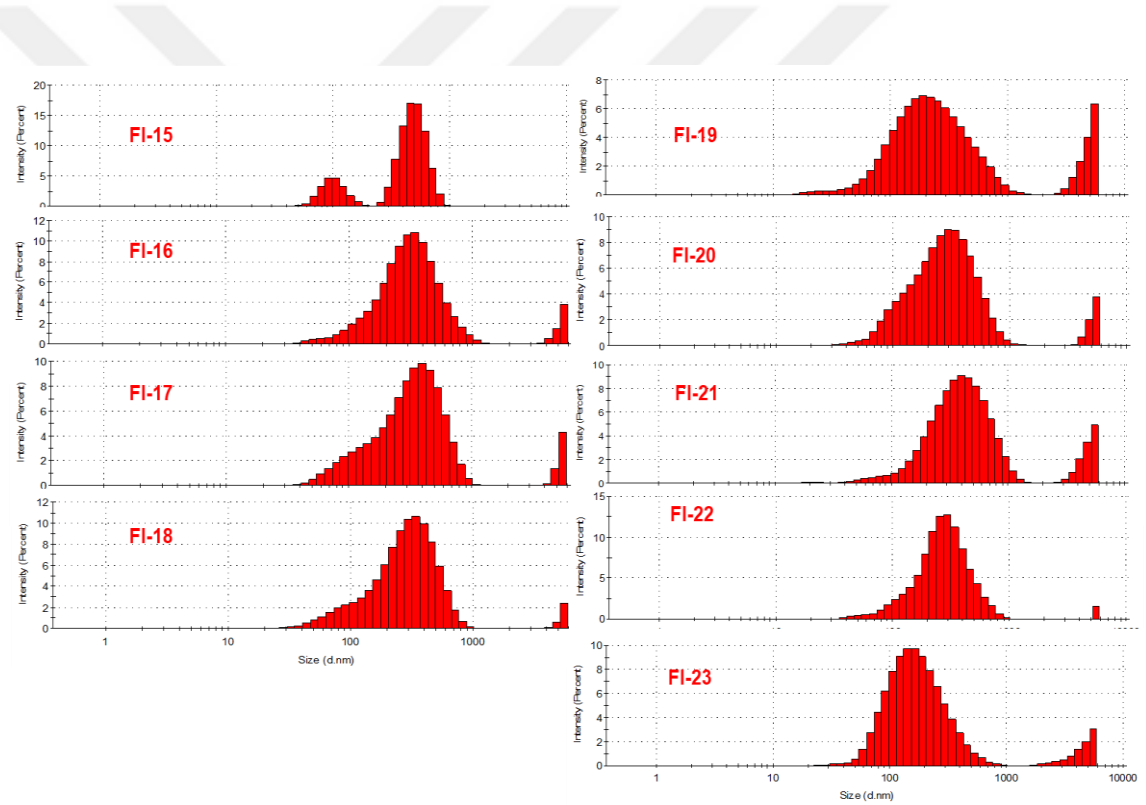
Formül kodu	Boyut $\pm$ SH (nm)	PDI $\pm$ SH	Zeta Potansiyeli $\pm$ SH (mV)	% Etkin Madde İçeriği	% Yükleme Etkinliği	%İşlem verimi
FI1	877,4 $\pm$ 20,1	0,655 $\pm$ 0,003	-14,5 $\pm$ 0,50	2,829	38,48	58,12
FI2*	-	-	-	-	-	-
FI3	562,8 $\pm$ 30,5	0,552 $\pm$ 0,023	-11,1 $\pm$ 0,50	0,2418	1,209	4,000
FI4	359,4 $\pm$ 27,5	0,449 $\pm$ 0,037	-13,4 $\pm$ 0,20	3,800	19,00	14,72
FI5	449,1 $\pm$ 40,0	0,499 $\pm$ 0,029	-10,6 $\pm$ 0,20	5,483	14,25	35,08
FI6	608,7 $\pm$ 16,7	0,635 $\pm$ 0,031	-7,97 $\pm$ 0,24	6,314	31,57	25,92
FI7	419,2 $\pm$ 14,8	0,471 $\pm$ 0,011	-8,38 $\pm$ 0,71	3,022	7,857	37,23
FI8	651,4 $\pm$ 31,5	0,642 $\pm$ 0,025	-11,9 $\pm$ 0,80	15,81	63,25	46,20
FI9	755,3 $\pm$ 13,4	0,619 $\pm$ 0,013	-13,6 $\pm$ 0,20	8,000	32,00	30,00
FI10	647,5 $\pm$ 15,5	0,554 $\pm$ 0,012	-15,0 $\pm$ 0,90	11,21	29,16	36,31
FI11	865,0 $\pm$ 24,6	0,744 $\pm$ 0,027	-16,2 $\pm$ 0,60	10,85	28,21	26,46
FI12	259,1 $\pm$ 6,5	0,498 $\pm$ 0,011	-15,6 $\pm$ 0,80	10,91	28,36	20,00
FI13	261,6 $\pm$ 9,4	0,342 $\pm$ 0,011	-12,5 $\pm$ 0,02	19,45	97,26	23,20
FI14	442,9 $\pm$ 20,4	0,441 $\pm$ 0,015	-14,9 $\pm$ 0,50	4,068	85,43	61,31

*Nanopartikül oluşmamıştır.

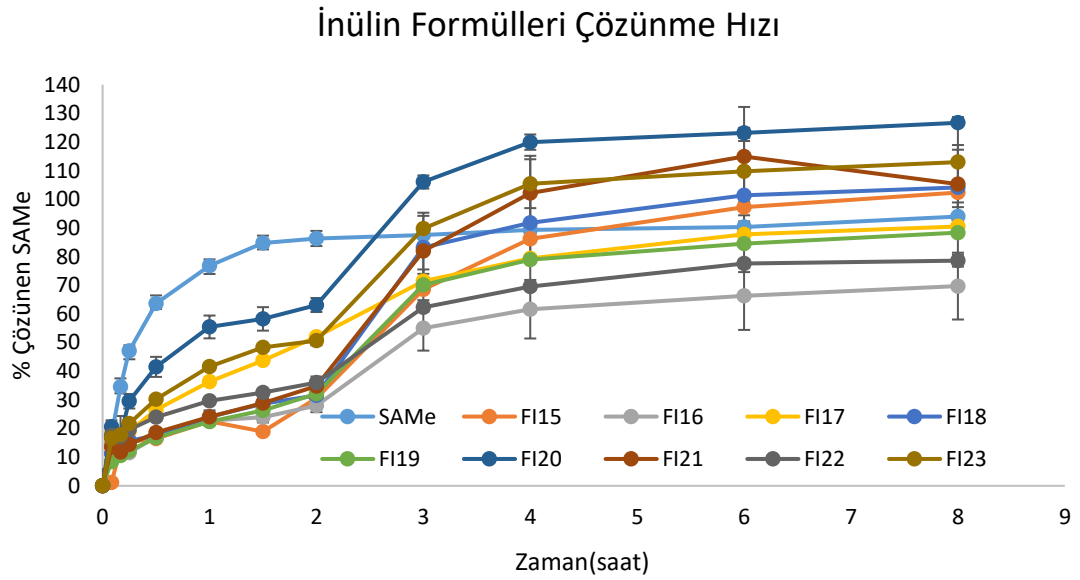
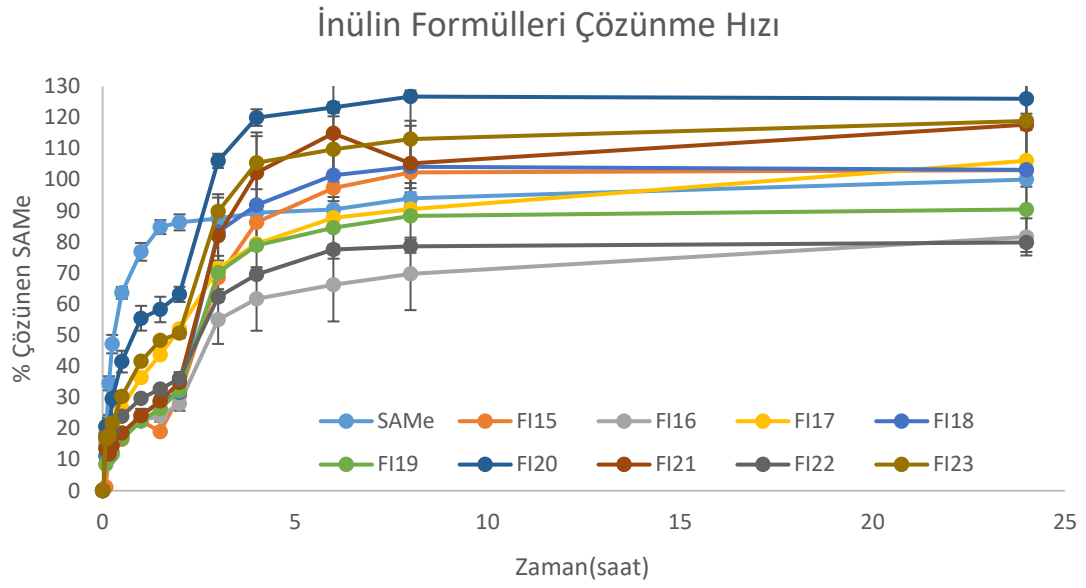
Formülasyonların karakterizasyonundan sonra SAME miktarı ve SAME ile SLS arasında iyon çifti oluşturarak yükleme etkinliğini artırmak için FI14 formülasyonundan hareketle formülasyon optimizasyonu için Çizelge 2.7’de bileşimleri verilen FI15 – F23 formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlara ilişkin karakterizasyonlar Çizelge 3.20’de ve partikül büyüklük dağılımları Şekil 3.25’te verilmiştir. Bu formüllerle hazırlanan nanopartiküllerden etkin madde salım profilleri Şekil 3.26’da verilmektedir. Bölüm 2.8.5’te yer alan Weibull eşitliği ile etkin maddenin % 63,2’sinin çözünmesi için geçen süreler (τ_d) hesaplanmıştır.

Çizelge 3.20. İnülin nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonuna ait bulgular.

Formül kodu	Boyut $\pm$ SH (nm)	PDI	Zeta Potansiyel $\pm$ SH (mV)	% Yükleme etkinliği $\pm$ SH	% Etkin Madde İçeriği $\pm$ SH	% Verim	τ_d (dk)
FI15	654,3 $\pm$ 19,2	0,580 $\pm$ 0,017	-8,13 $\pm$ 0,22	73,86 $\pm$ 18,76	6,06 $\pm$ 1,54	67,91	170,8
FI16	390,7 $\pm$ 16,2	0,478 $\pm$ 0,195	-8,54 $\pm$ 0,06	68,73 $\pm$ 17,24	5,93 $\pm$ 1,48	65,60	473,2
FI17	364,0 $\pm$ 6,70	0,563 $\pm$ 0,031	-10,9 $\pm$ 0,30	18,00 $\pm$ 5,46	1,61 $\pm$ 0,49	61,37	147,8
FI18	334,0 $\pm$ 14,2	0,449 $\pm$ 0,021	-6,89 $\pm$ 0,79	72,33 $\pm$ 1,00	10,06 $\pm$ 0,14	67,46	193,8
FI19	313,5 $\pm$ 23,3	0,494 $\pm$ 0,056	-8,18 $\pm$ 0,17	46,50 $\pm$ 8,48	7,05 $\pm$ 1,29	61,58	248,4
FI20	293,4 $\pm$ 5,80	0,428 $\pm$ 0,026	-13,9 $\pm$ 0,80	15,60 $\pm$ 0,55	2,52 $\pm$ 0,09	60,69	110,6
FI21	434,8 $\pm$ 14,6	0,446 $\pm$ 0,022	-9,18 $\pm$ 0,27	71,85 $\pm$ 6,76	13,00 $\pm$ 1,22	67,10	334,0
FI22	382,4 $\pm$ 16,7	0,440 $\pm$ 0,029	-11,2 $\pm$ 1,69	63,38 $\pm$ 6,54	12,86 $\pm$ 1,33	62,61	314,8
FI23	193,9 $\pm$ 11,9	0,417 $\pm$ 0,037	-15,5 $\pm$ 1,30	18,61 $\pm$ 1,26	4,11 $\pm$ 0,28	56,60	129,9



Şekil 3.25. SAME miktarı ve SAME ile SLS arasında iyon çifti oluşturarak yükleme etkinliğini artırmak için hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımı.



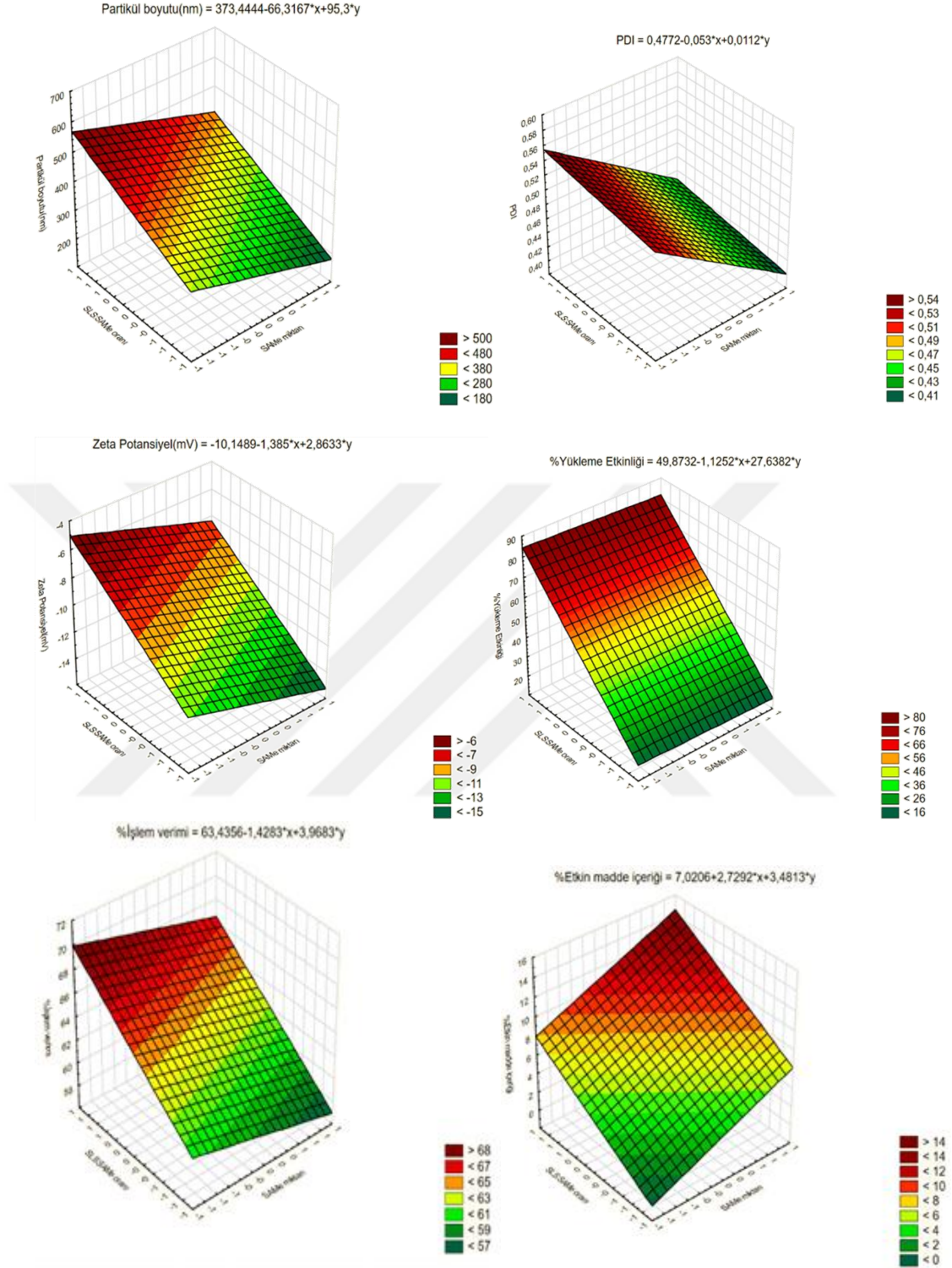
Şekil 3.26. Optimizasyon için hazırlanan inülin nanopartiküllerinden etkin maddenin salım profilleri (üst profil 24 saatlik profili, alt profil ilk 8 saatlik profili göstermektedir).

FI15-FI23 formülasyonları üç düzey – iki faktörlü (3^2) olmak üzere tasarlanmıştır. Çizelge 2.6’da tasarım faktörleri gösterilmiştir. Uygulanan MLR analizinin sonuçları Çizelge 3.21’de görülmektedir. Şekil 3.27’de ise önemli bulunan faktörlerle nanopartiküllerin özelliklerinin değişimi gösterilmektedir.

Çizelge 3.21. MLR analizinin sonuçları ve varyans analizinden (ANOVA) elde edilen P değerleri.

Cevap faktörler		Bağımsız değişkenler			
		(SAm miktarı) X ₁	(SLS:SAm oranı) X ₂	Intercept	R
Partikül Büyüklüğü	Katsayı	-66,3	95,3	373,4	0,7983
	p	0,113	0,037*	0,000***	
PDI	Katsayı	-0,053	0,011	0,477	0,8014
	p	0,018*	0,524	0,000***	
Zeta Potansiyel	Katsayı	-1,39	2,86	-10,2	0,9016
	p	0,068	0,004**	0,000***	
% Yükleme Etkinliği	Katsayı	-1,13	27,6	49,9	0,9325
	p	0,806	0,001***	0,000***	
% Etkin Madde İçeriği	Katsayı	2,73	3,48	7,02	0,9000
	p	0,013*	0,004**	0,000***	
% İşlem verimi	Katsayı	-1,43	3,97	63,4	0,9552
	p	0,037*	0,000***	0,000***	
τ _d (dk)	Katsayı	-2,18	51,7	236	0,3771
	p	0,968	0,357	0,001*	

*p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001



Şekil 3.27. SAME miktarı ve SAME:SLS oranının nanopartiküllerin karakteristikleri üzerine etkisini gösteren cevap - yüzey grafiği.

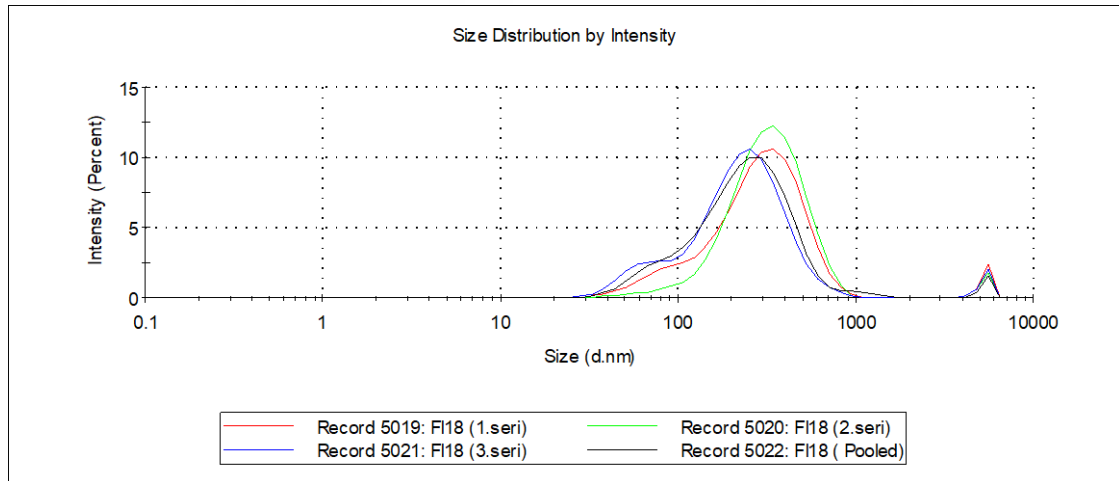
İnülin Nanopartiküllerinin Üretiminin Tekrarlanabilirliğinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

İnülin nanopartiküllerinin üretiminin tekrarlanabilirlik çalışmaları seçilen optimum formülasyon üzerinde (FI18), Bölüm 2.9.6'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. İşlem sonuçları Çizelge 3.22'de, partikül büyüklük dağılımları Şekil 3.28'de verilmiştir.

Çizelge 3.22. FI18 formülünün tekrarlanabilirlik sonuçları.

Formül kodu	Boyut $\pm$ SH (nm)	PDI	Zeta Potansiyel $\pm$ SH (mV)	% Yükleme Etkinliği $\pm$ SH	% Etkin Madde İçeriği $\pm$ SH	% Verim
FI18 (1p)	334,0 $\pm$ 14,2	0,449 $\pm$ 0,021	-6,89 $\pm$ 0,79	72,33 $\pm$ 1,00	10,06 $\pm$ 0,14	67,46
FI18 (2p)	354,4 $\pm$ 5,8	0,434 $\pm$ 0,007	-14,7 $\pm$ 0,1	79,62 $\pm$ 6,87	11,07 $\pm$ 0,95	68,66
FI18 (3p)	301,7 $\pm$ 12,7	0,409 $\pm$ 0,008	-10,6 $\pm$ 0,6	71,70 $\pm$ 6,62	9,970 $\pm$ 0,921	69,41
FI18*	317,3 $\pm$ 19,1	0,371 $\pm$ 0,036	-15,4 $\pm$ 1,3	87,75 $\pm$ 4,37	12,20 $\pm$ 0,61	65,14
FI18*	300,9 $\pm$ 12,0	0,433 $\pm$ 0,013	-16,7 $\pm$ 1,2	93,68 $\pm$ 7,22	12,84 $\pm$ 1,24	-

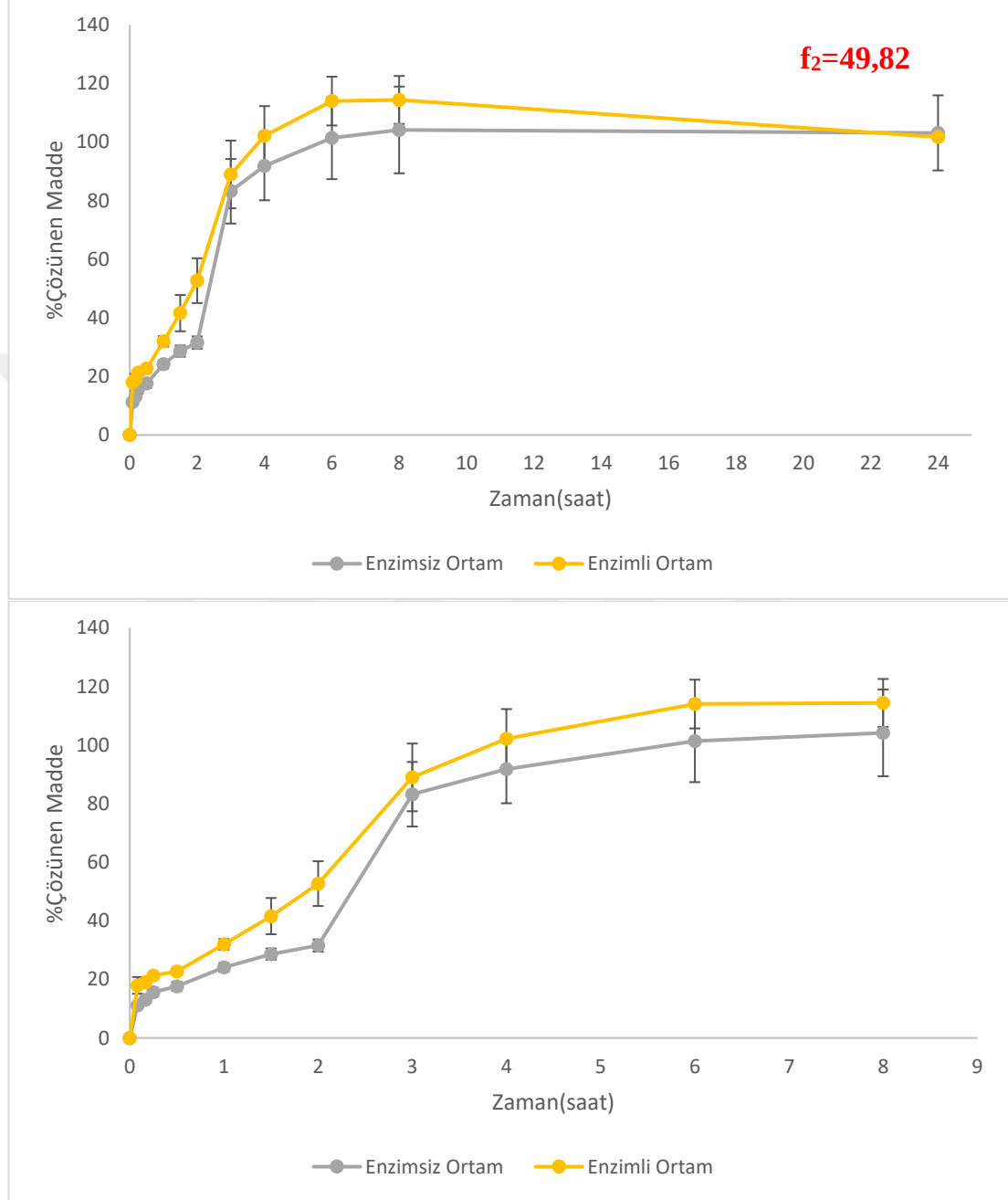
* 2 dispersiyon birleştirilerek kurutulmuştur. ** Tüm paralel kuru toz kütlesi birleştirilmiştir.



Şekil 3.28. Üretilen 3 paralel formülün ve birleştirilmiş kütlenin partikül boyut dağılımı.

Seçilen FI18 formülü ile hazırlanan nanopartiküllerden, enzim içeren SGF ve SCoF ortamlarında da etkin madde çözünme testi aynı şekilde yapılmıştır. SGF içine 0,1 mg/ml konsantrasyonda pepsin, SCoF içine ise 5 IU/ml miktarda inülinaz ilave edilmiştir. Enzimli ve enzimsiz ortamlarda uygulanan testler sonucunda salım

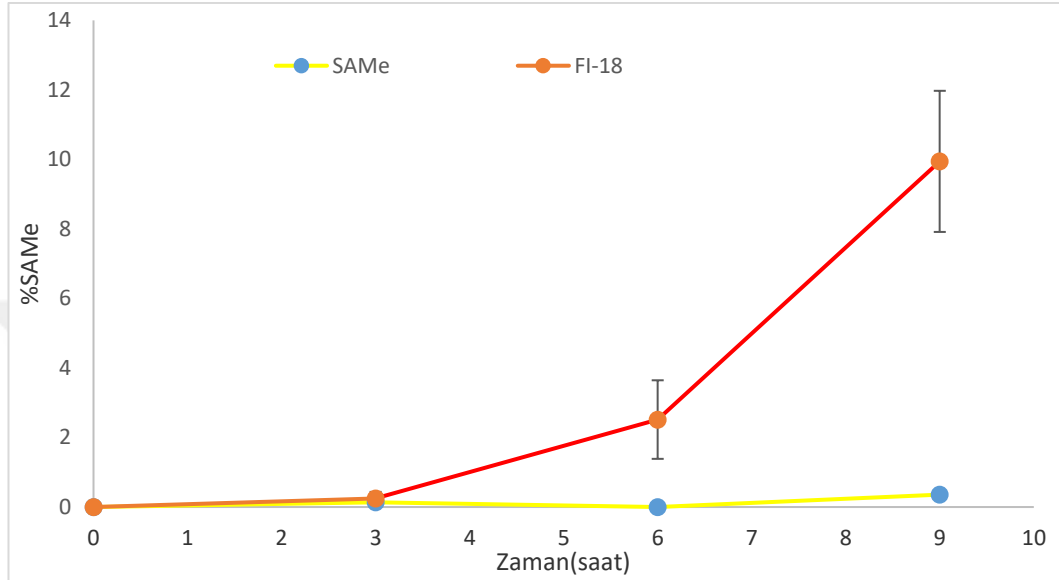
farklılığının değerlendirilmesi için hesaplanan f_2 benzerlik faktörleri grafikler üzerinde yer almaktadır (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. Enzimli ve enzim içermeyen ortamlarda, FI18 formülasyonu ile hazırlanan inülin nanopartiküllerinden etkin maddenin çözünme profilleri (üst profil 24 saatlik SAME salımını, alt profil ilk 8 saatlik salımı göstermektedir) ve f_2 benzerlik faktörü.

Yapay Membran (PAMPA) Modeli Kullanılarak İnülin Nanopartiküllerden SAME Permeabilitesinin Tayinine Ait Bulgular

İnülin nanopartiküllerinden etkin maddenin in vitro permeabilitesi Bölüm 2.8.6’da anlatıldığı şekilde yapay membran modeli (PAMPA) ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 3.30 ve Çizelge 3.23’te verilmiştir.



Şekil 3.30. SAME'nin yapay membranlardan permeasyonu üzerinde inülin nanopartikül formülasyonunun etkisi.

Çizelge 3.23. İnülin nanopartiküllerinden PAMPA ile elde edilen permeabilite bulguları.

	Permeabilite katsayısı (cm/saat)
Saf SAME*	131x10 ⁻⁶
FI18**	16155x10 ⁻⁶

*Tüm noktalar alınarak hesaplanmıştır.

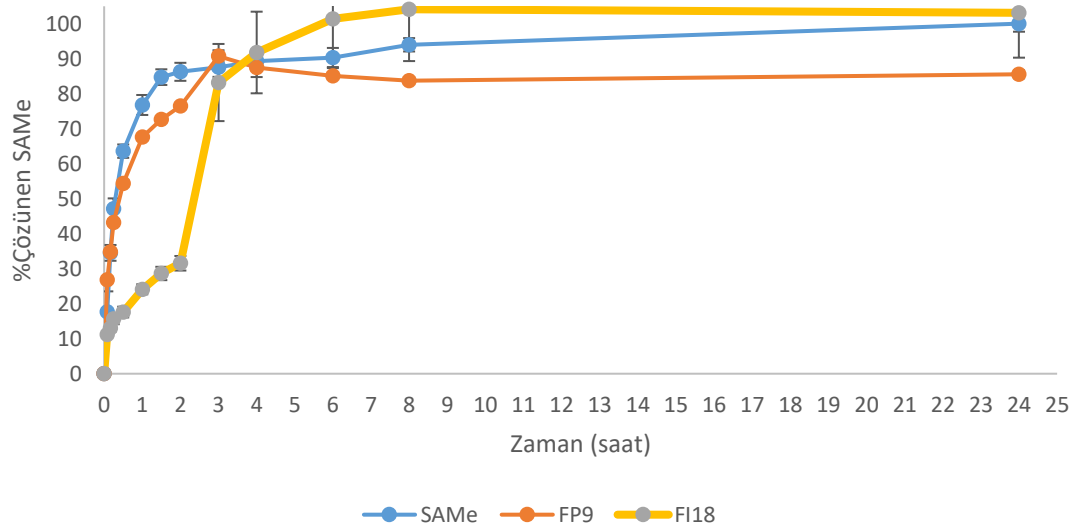
**Son 3 nokta alınarak hesaplanmıştır.

3.5.Optimum Formülün Seçilmesi

Yukarıda bulguları verilen formülasyon çalışmalarının sonucunda seçilen pektin nanopartiküllerinin üretimi için FP9 ve inülin nanopartiküllerinin üretimi için FI18 formülasyonlarından hazırlanan nanopartiküllere ilişkin in vitro özellikler Çizelge 3.24’de verilmektedir. İn vitro salım profilleri ise Şekil 3.31’de görülmektedir.

Çizelge 3.24. Optimum formülasyonlardan hazırlanan nanopartiküllerin özellikleri ($\pm$ SH).

	FP9	FI18
% Yükleme etkinliği	41,34 $\pm$ 1,608	92,38 $\pm$ 8,95
% Etkin Madde İçeriği	5,392 $\pm$ 0,2097	12,84 $\pm$ 1,24
% S,S izomeri	60,85 $\pm$ 0,0864	57,10 $\pm$ 0,23
% R,S izomeri	39,15 $\pm$ 0,086	42,90 $\pm$ 0,23
Partikül Büyüklüğü (nm)	294,7 $\pm$ 28,99	301,0 $\pm$ 16,27
PDI	0,443 $\pm$ 0,022	0,441 $\pm$ 0,013
Zeta Potansiyel (mV)(n=4)	-19,10 $\pm$ 1,160	-16,70 $\pm$ 1,24
τ_d (dakika)	56,55	193,80
P (cm/saat)	2,270 $\times 10^{-3}$	10,71 $\times 10^{-3}$

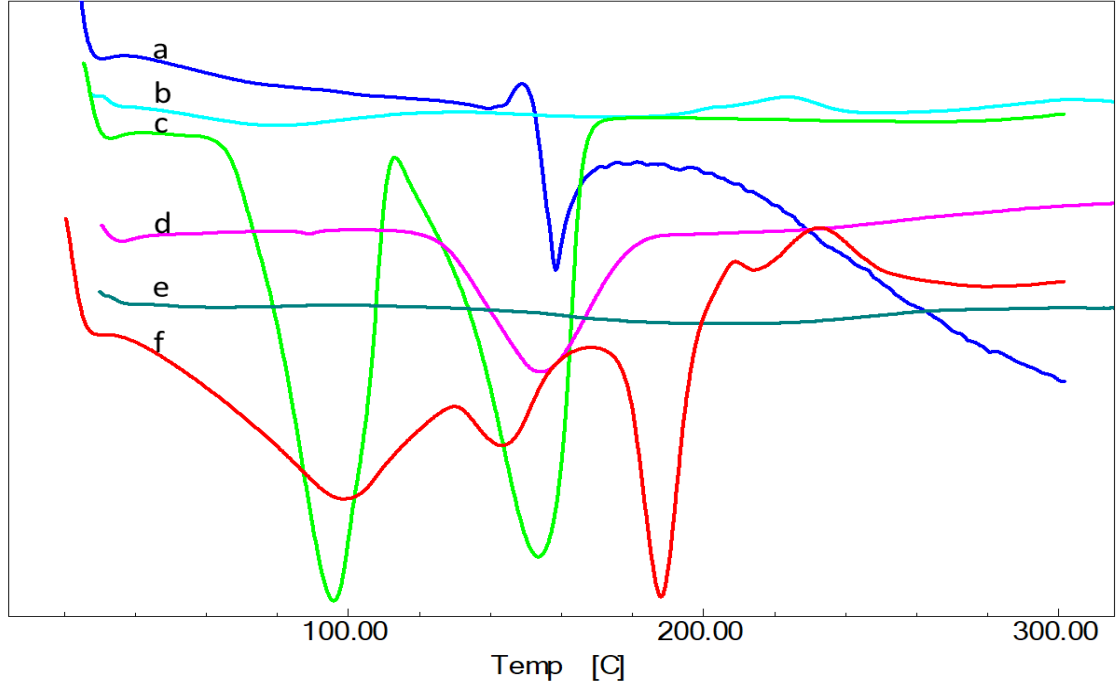


Şekil 3.31. Optimum formülasyonlardan hazırlanan nanopartiküllerden etkin madde salım profilleri.

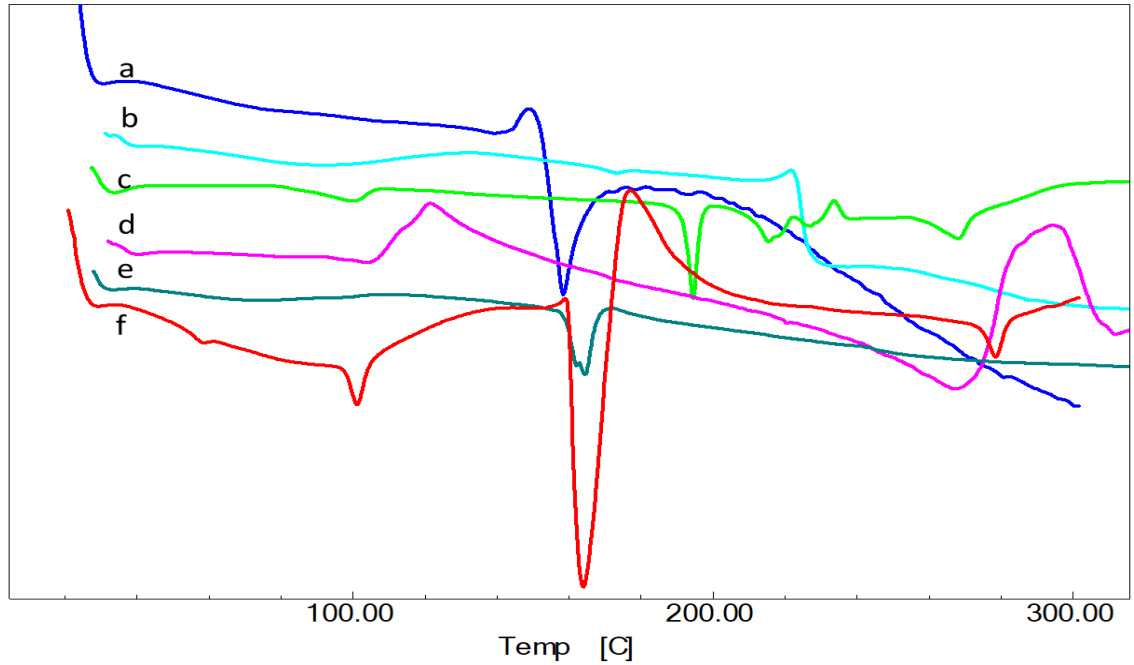
3.5.1. Seçilen Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesine Ait Bulgular

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Seçilen nanopartikül formülasyonlarına ait termogramlar Şekil 3.32-3.33 'de verilmektedir.



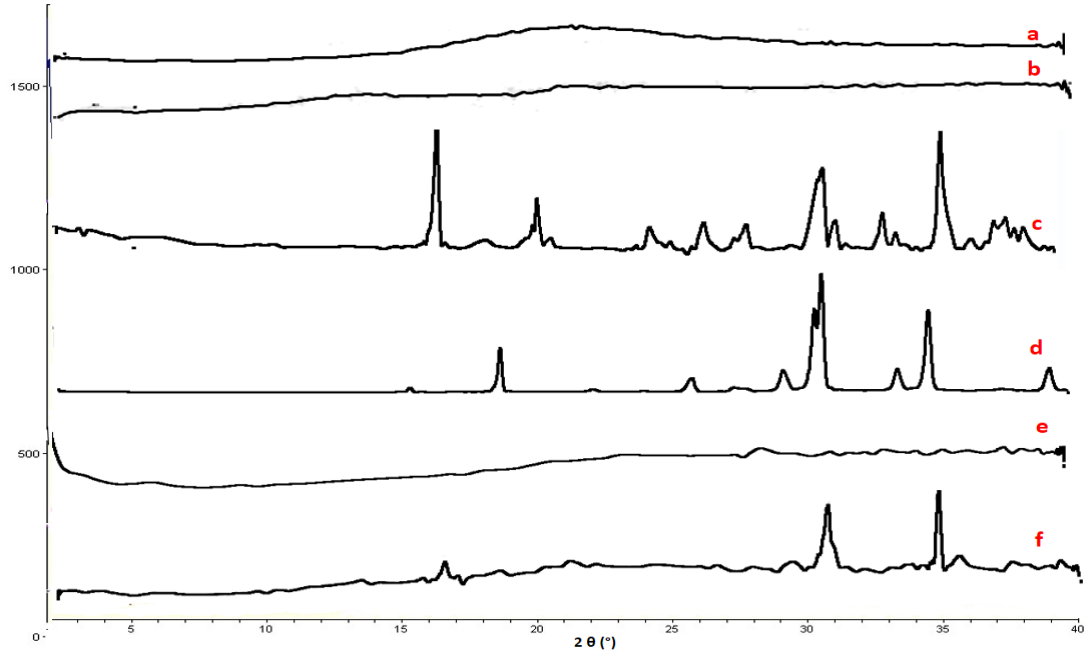
Şekil 3.32. FP9 formülasyonuna ait DSC termogramları (a:SAMe, b:Pektin, c:BaCl₂, d: NaHCO₃, e:FP9 nanopartikülleri, f:FP9 fiziksel karışım) .



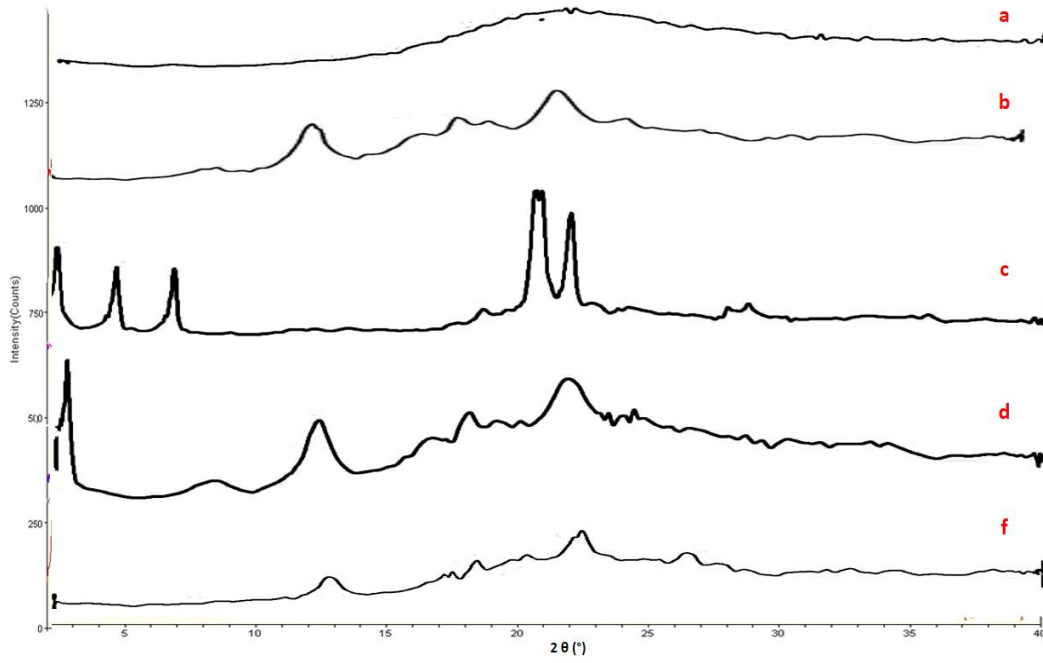
Şekil 3.33. FI18 formülasyonuna ait DSC termogramları (a: SAMe, b: İnülin, c: SLS, d: EDC, e: FI18 nanopartikülleri, f: FI18 fiziksel karışım)

X Işını Difraktometrisi (XRPD)

Seçilen formüllerin difraktogramları Şekil 3.34-3.35’de verilmektedir.



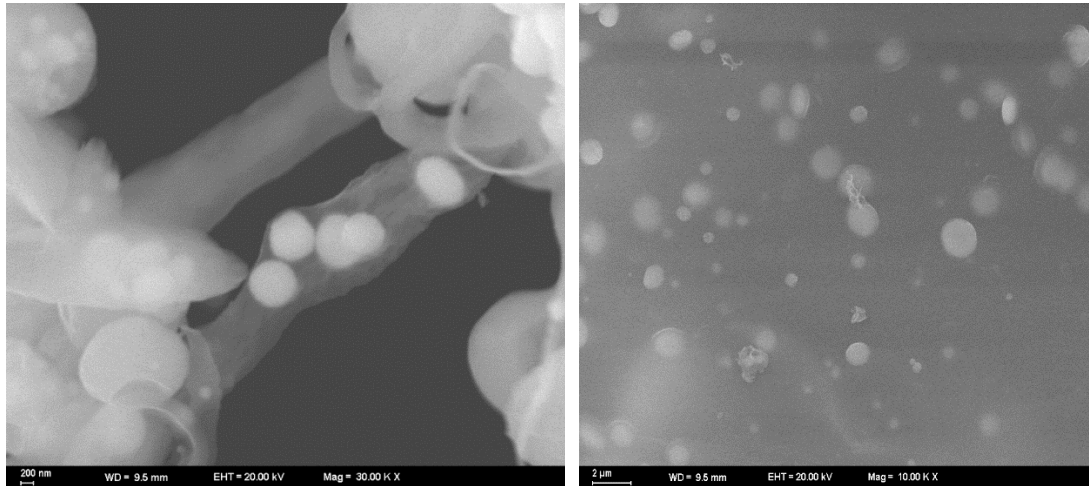
Şekil 3.34. FP9 formülasyonuna ait X ışını difraktogramları (a: SAME, b: pektin, c: BaCl2, d:NaHCO3, e: FP9 nanoparticülleri, f: FP9 fiziksel karışım).



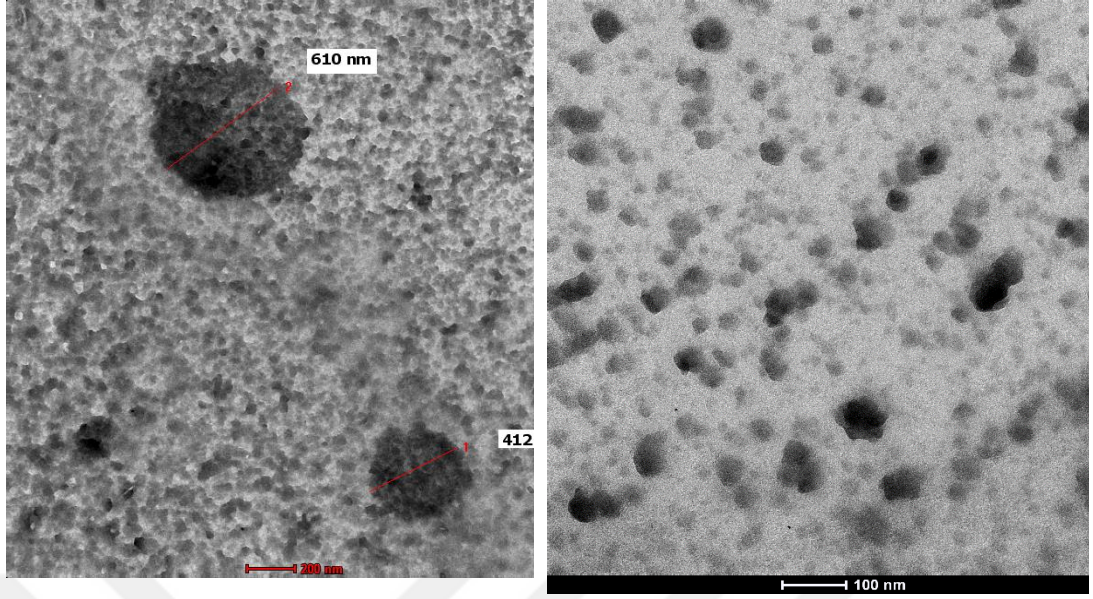
Şekil 3.35. FI18 formülasyonuna ait X ışını difraktogramları (a: SAME, b: İnülin, c: Sodyum lauril sülfat, d: FI18 nanopartikülleri, f: FI18 fiziksel karışım).

3.5.2. Nanopartiküllerin Görüntülenmesine Ait Bulgular

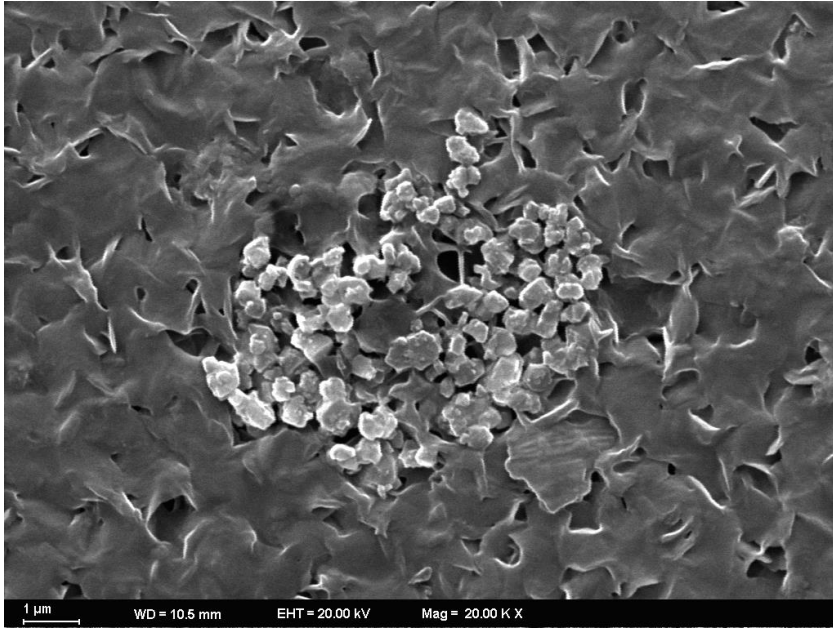
Seçilen nanopartiküllere ait SEM ve TEM görüntüleri sırasıyla Şekil 3.36-3.37’de verilmiştir.



Şekil 3.36. FP9 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerin SEM görüntüleri .



Şekil 3.37. FP9 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerin TEM görüntüleri.



Şekil 3.38. FI18 formülasyonu ile üretilen nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

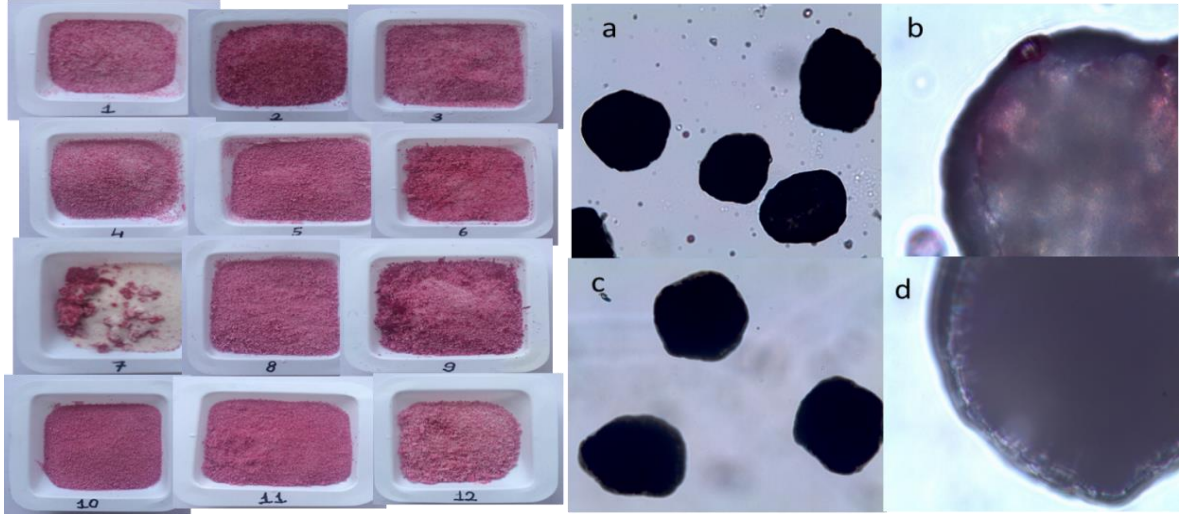
3.6.Etkin Madde Salımının Modifiye Edilmesi için Çalışmalara Ait Bulgular

3.6.1. Akışkan Yatak Cihazında Kaplama Prosesinin Ön Denemelerine İlişkin Bulgular

Akışkan yatakta inert pelletler üzerine kaplama için Çizelge 2.9’da belirtildiği şekilde çok sayıda deney yapılmıştır. Her bir deneyde ulaşılan sonuçlar ve karşılaşılan problemler Çizelge 3.25’te verilmektedir. Ayrıca elde edilen ürünlerin fotoğrafları ve mikroskop görüntüleri ise Şekil 3.39’da görülmektedir.

Çizelge 3.25. Kaplama deneylerinin optimizasyonuna yönelik çalışmalara ilişkin gözlem ve yorumlar.

	%İşlem verimi	Yorum
P1	63,30	Homojen kaplama yapılamadı
P2	81,05	Homojen kaplama yapılamadı
P3	79,57	Tıkanma oldu, tekrarlandı
P4	73,66	8 rpm az geldi fakat segregasyon yok.
P5	82,65	Başarılı oldu.
P6	81,28	İlk aşama iy, geçti, ikinci aşamada partiküller aşağıda kaldı.
P7	76,44	Tıkanmış, beyazken aşağıda birikme oldu.
P8	81,04	Çepemde toplanma yok, homojen ve başarılı sonuç elde edildi.
P9	82,74	İlk aşama başarılı, ikinci aşamada çepere yapıştı, segregasyon oldu.
P10	91,22	Kaplama ve kurutma başarılı.
P11	86,72	Az miktarda topaklanma var, kaplama kurutma iyi.
P12	75,55	Homojen, başarılı.
P13	-	Cihaz içinde toz dağılımı güzel oldu, birikme olmadı, başarılı HPMC kaplaması oldu. Eudragit kaplamasında ilk aşamada ince hortum tıkanmış, ikinci aşamada kalın hortum kullanıldı fakat bu sefer cihazda tıkanma oldu.
P14	-	Cihaz tıkanmış. İnce hortum kullanıldı.
P15	-	Eudragit çözeltisi aralıksız verildi. İnce hortum kullanıldı.
P16	-	P15 pelletleri tekrar kullanıldı. Aralıksız Eudragit çözeltisi verildi. Cihaz tıkanmış.
P17	-	Cihaz tıkanmış.
P18	-	Cihaz tıkanmış.
P19	-	Hortumda tıkanma olduğu için durduruldu, beyazlama vardı.

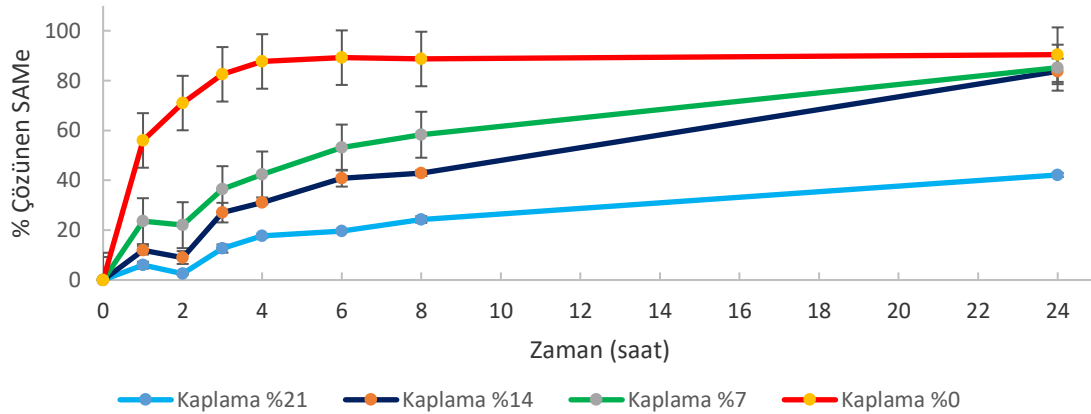


Şekil 3.39. Kaplamadan elde edilen ürünlerin fotoğrafları ve mikroskop görüntüleri.

Yukarıda belirtilen ön formüllerdeki tıkanma problem Eudragit FS30D polimeri yerine Eudragit L30D-55 kullanılarak ve bazı parametreler değiştirilerek (Çizelge 2.10) çözülmüştür.

Fonksiyonel Kaplama Oranının Belirlenmesine İlişkin Çalışmalara Ait Bulgular

Kaplama çalışmaları Bölüm 2.10.1’de belirtildiği şekilde sadece SAME kullanılarak yürütülmüştür. Elde edilen SAME yüklü pelletlerden etkin madde salımı Bölüm 2.10.2.5’te belirtildiği şekilde uygulanmıştır. Şekil 3.40’da farklı kaplama oranlarına karşılık pelletlerden SAME salım profilleri görülmektedir.



Şekil 3.40. Farklı kaplama oranlarına sahip pelletlerle yapılan çözünme hızı grafiği .

Bu salım profillerine göre geciktirilmiş bir salım için farmakope limitlerine uygun profilin elde edildiği kaplama oranı % 14 a/a olmuştur.

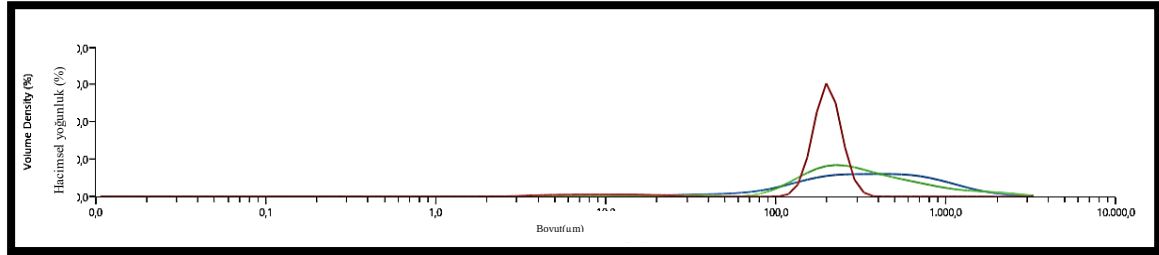
3.6.2 Kaplanmış Pelletlerde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Kaplanmış pelletlere ait partikül büyüklüğü Bölüm 2.10.2.1’de belirtildiği gibi ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 3.26, Şekil 3.41 ve Şekil 3.42’de verilmektedir.

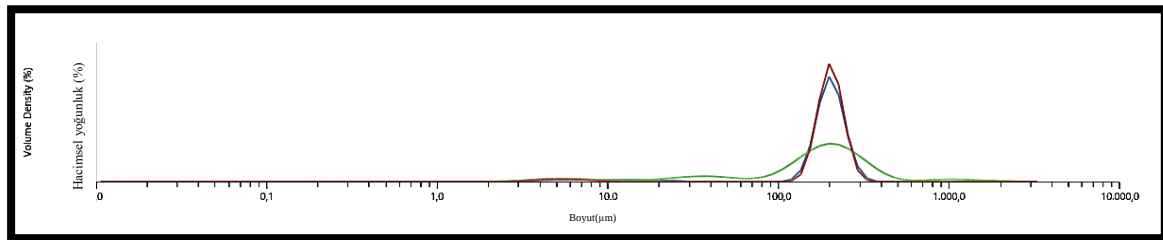
Çizelge 3.26. İnülin ve pektin nanopartiküllerinin kaplanmış olduğu pelletlerin partikül büyüklük verileri ;
D_v:Hacim çapı; Span=(D_{v90} - D_{v10})/ D_{v50}.

	D _{v10} (µm)	D _{v50} (µm) Medyan	D _{v90} (µm)	D[3:2] (µm) (Hacim/yüzey ortalaması)	D[4:3] (µm) (Hacim ortalaması)	Span
K ₀ *	144	197	254	70,1	191	0,557
K ₁ FI18	141	199	266	67,5	196	0,631
K ₁ FP9	123	287	990	164	456	3,024
K ₂ FI18	44,6	201	432	66,1	265	1,930
K ₂ FP9	98,2	346	1060	187	487	2,778

*K₀: Kaplanmamış inert pellet



Şekil 3.41. Pektin nanopartiküllerinin kaplandığı pelletlerin partikül büyüklüğü dağılımları (Kırmızı: K₀, Yeşil: K₁-FP9, Mavi: K₂-FP9).



Şekil 3.42. İnülin nanopartiküllerinin kaplandığı pelletlerin partikül büyüklüğü dağılımları (Mavi: K₀, Kırmızı: K₁-FI18, Yeşil: K₂-FI18).

Kaplanmış Pelletlere Ait Zeta Potansiyel Bulguları

Kaplanmış pelletlere ait zeta potansiyel değerleri Bölüm 2.10.2.2’de belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Bulgular Çizelge 3.27’de verilmektedir.

Çizelge 3.27. Nanopartikül kaplanmış pelletlerin zeta potansiyelleri.

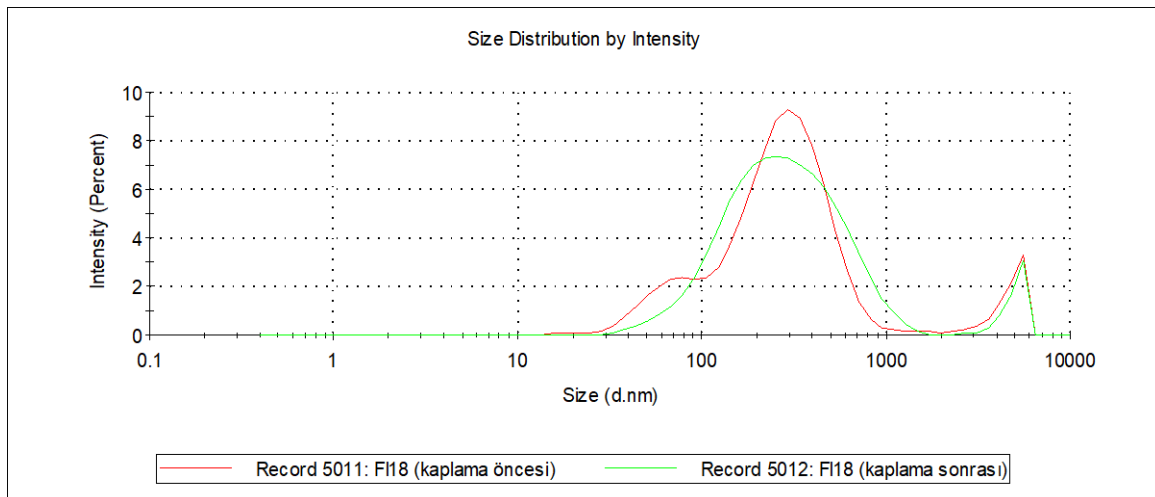
	Zeta Potansiyel $\pm$ SH (mV) (n=6)
K ₀	-2,46 $\pm$ 0,22
K ₁ FI18	-11,3 $\pm$ 0,49
K ₁ FP9	-18,1 $\pm$ 0,84
K ₂ FI18	-18,3 $\pm$ 0,58
K ₂ FP9	-19,6 $\pm$ 0,58

Rekonstitüsyon çalışmalarına Ait Bulgular

Fonksiyonel kaplama sonrası nanopartiküllerin yapısını ve özelliklerini koruyup korumadığını incelemek için Bölüm 2.10.2.3’te belirtilen şekilde yapılmıştır. Rekonstitüsyon sonuçları Çizelge 3.28 ve 3.29’te ve Şekil 3.43 ve 3.44’te verilmektedir.

Çizelge 3.28. FI18 formülasyonu ile hazırlanan nanopartiküllerin kaplama öncesi ve sonrası partikül boyutları.

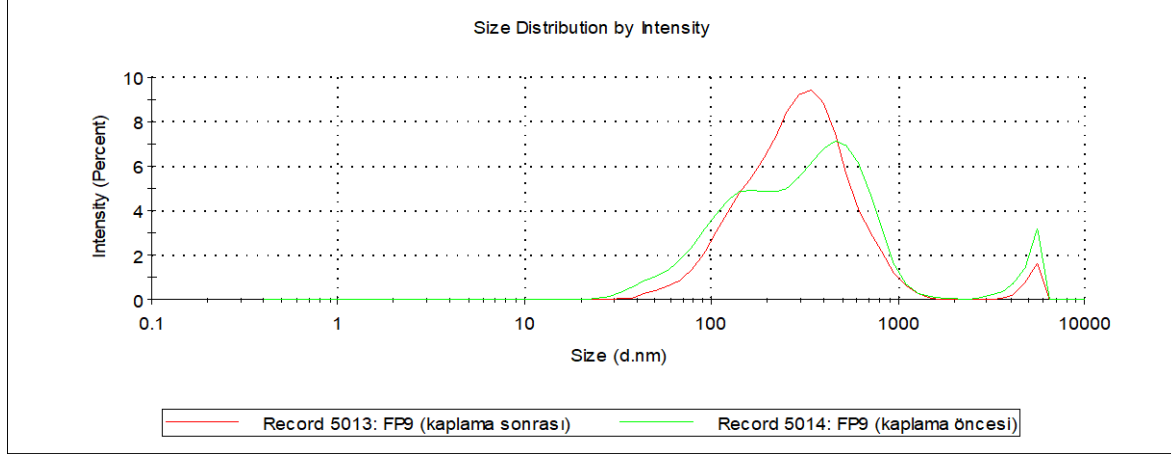
	Size (nm) (n=10)	PDI
Kaplama öncesi FI18	302,6 $\pm$ 38,48	0,456 $\pm$ 0,03
Kaplama sonrası FI18	304,7 $\pm$ 17,89	0,531 $\pm$ 0,02



Şekil 3.43. FI18 formülasyonu ile hazırlanan nanopartiküllerin kaplama öncesi ve sonrası partikül büyüklüğü dağılım grafiği.

Çizelge 3.29. FP9 formülasyonu ile hazırlanan nanopartiküllerin kaplama öncesi ve sonrası partikül boyutları.

	Size (nm) (n=10)	PDI
Kaplama öncesi FP9	330,1±13,70	0,539±0,035
Kaplama sonrası FP9	336,8±21,68	0,458±0,020



Şekil 3.44. FP9 formülasyonu ile hazırlanan nanopartiküllerin kaplama öncesi ve sonrası partikül büyüklüğü dağılım grafiği.

Kaplanmış Pelletlerde Yapılan Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular

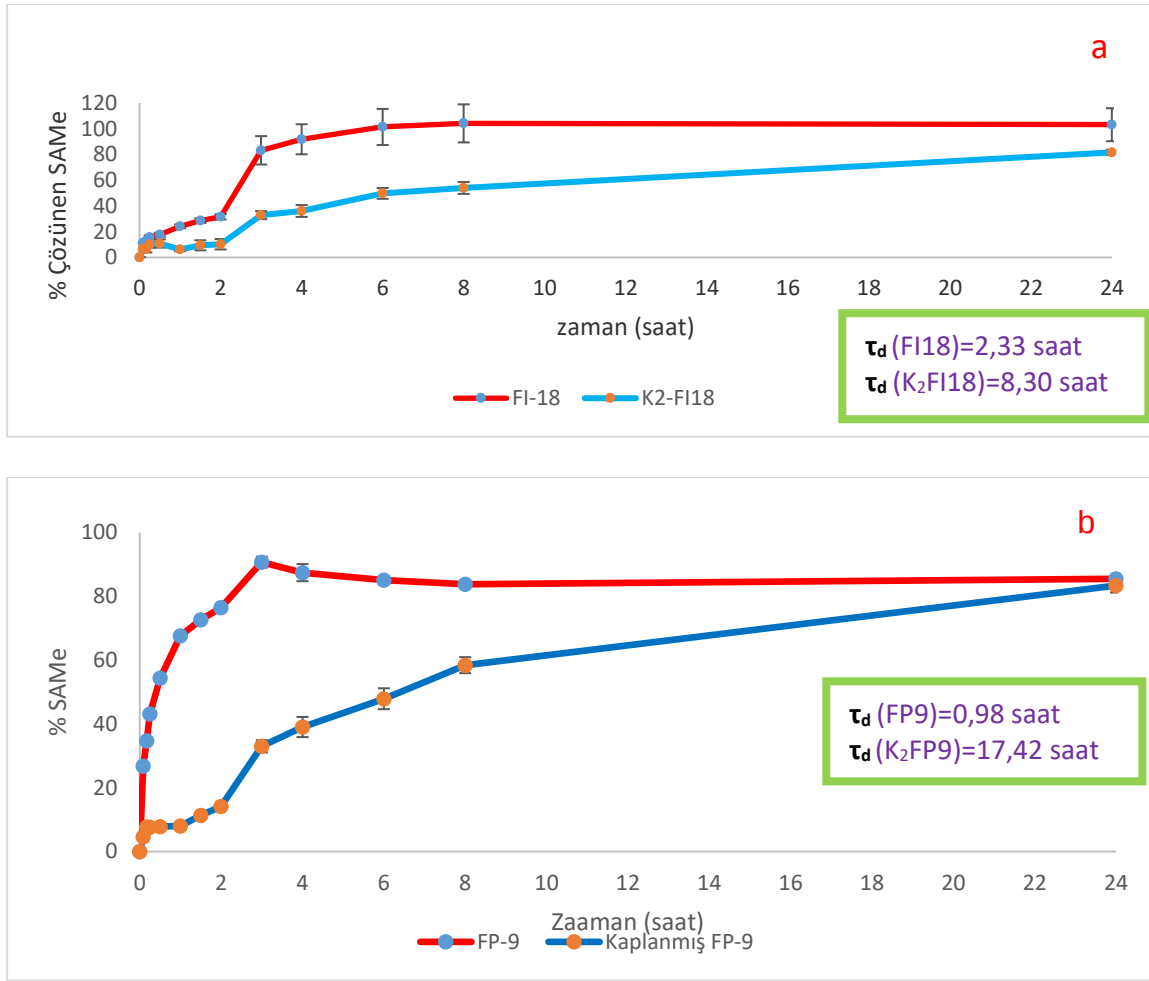
Kaplı pelletlerde yapılan miktar tayininde (Bölüm 2.10.2.4) elde edilen sonuçlar Çizelge 3.30’da verilmektedir.

Çizelge 3.30. Nanopartikül kaplanmış pelletlere ait etkin madde miktar tayini sonuçları.

	K ₂ FI18	K ₂ FP9
% SAmE içeriği	1,26±0,10	0,32±0,013
% S,S izomeri	68,93±0,57	60,16±0,47
% R,S izomeri	31,06±0,57	39,83±0,47

Kaplanmış Pelletlerden Etkin Madde Salımının Tayinine Ait Bulgular

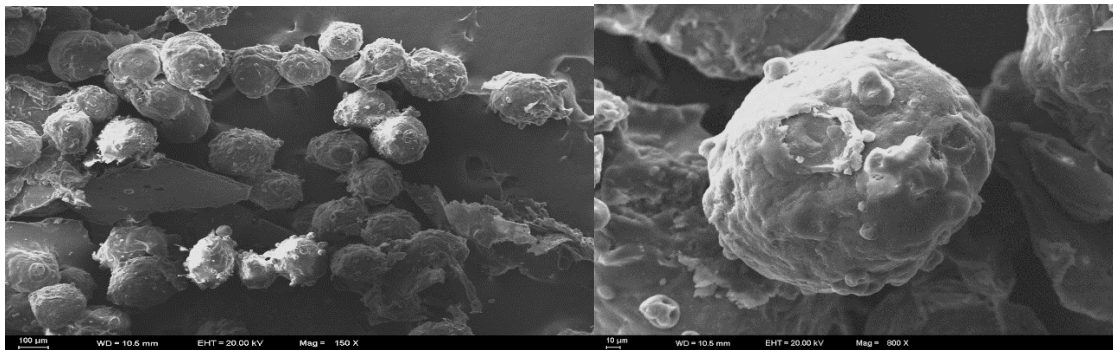
Kaplanmış pelletlerden etkin madde salım tayini Bölüm 2.10.2.5’te belirtildiği şekilde yapılmıştır (Şekil 3.45).



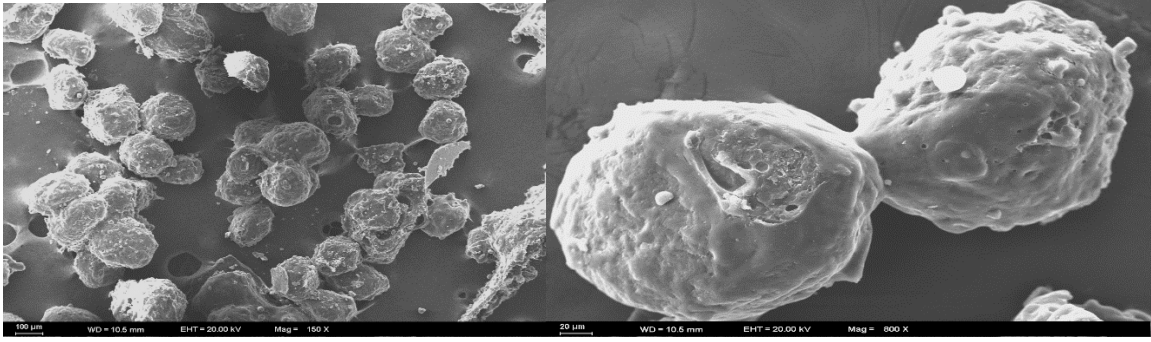
Şekil 3.45. Nanopartiküller ve kaplanmış formlere ait etkin madde salım profilleri (a: K₂FI18 formülünde çözünme hızı çalışmaları, b: K₂FP9 formülünde çözünme hızı çalışmaları)

3.6.2 Pelletlerin Görüntülenmesi

Kaplı pelletlerin SEM görüntüleri Şekil 3.46-3.47’de verilmektedir.



Şekil 3.46. Pektin nanopartikülleri ile hazırlanan K₂FP9 pellet formülüne ait SEM görüntüleri.



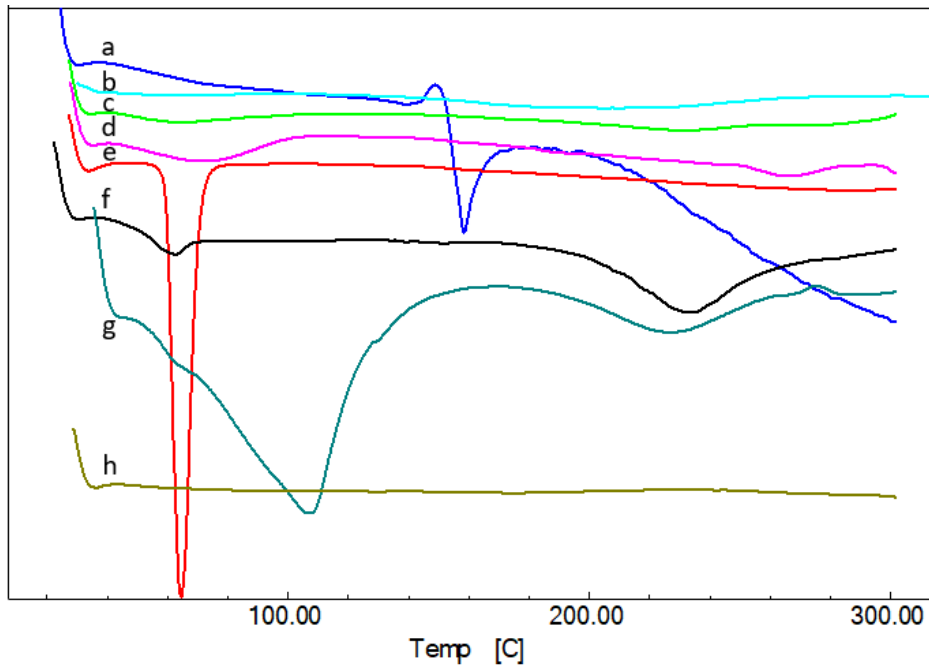
Şekil 3.47. İnülin nanopartikülleri ile hazırlanan K₂FI18 pellet formülüne ait SEM görüntüleri.

3.6.3. Pelletlerde Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesine Ait Bulgular

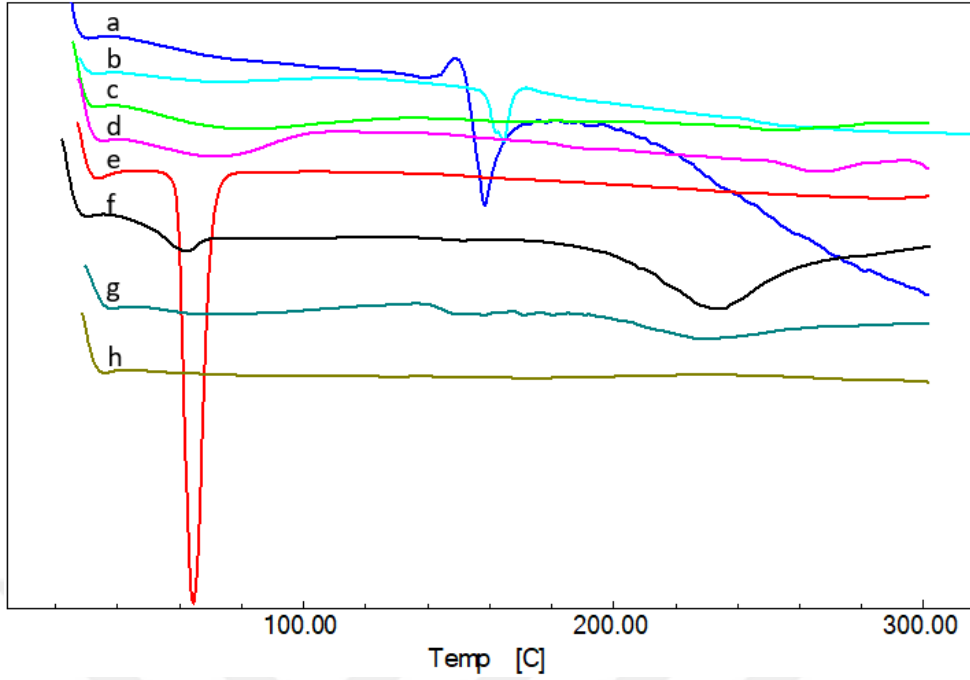
Kaplı formüllerdeki etkin madde ve yardımcı madde etkileşimleri Bölüm 2.10.4'te belirtildiği şekilde incelenmiştir.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizleri

Kaplı pellet formüllerine ait yardımcı maddeler ve formülün termogramları Bölüm 2.10.3.4'te belirtildiği şekilde incelenmiştir. Bulgular Şekil 3.48-3.49'da verilmiştir.



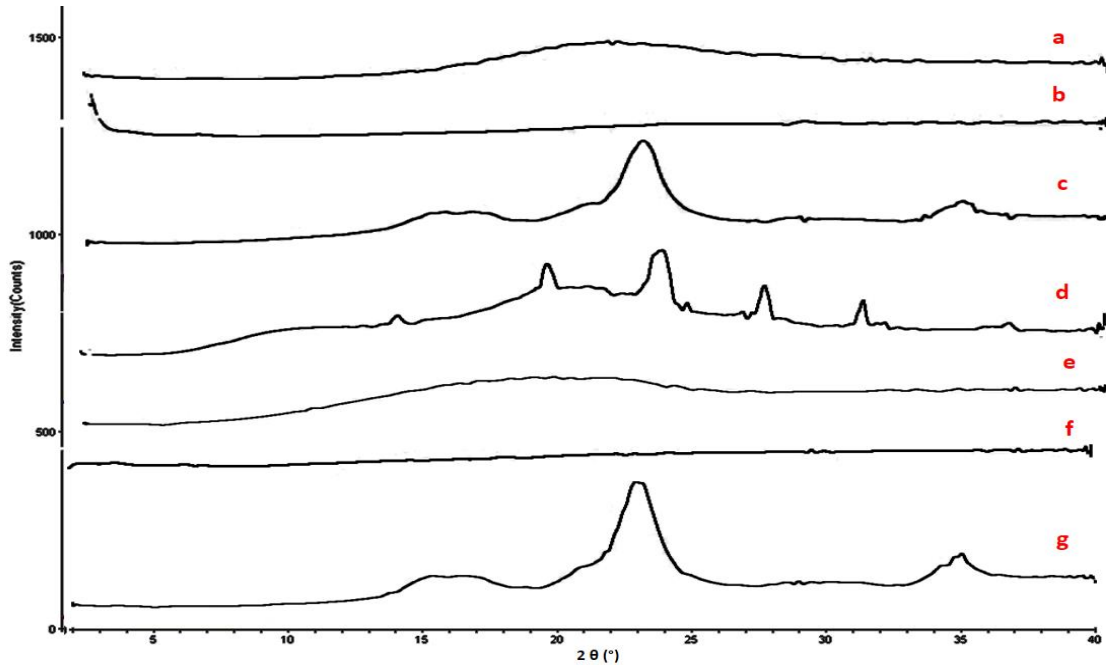
Şekil 3.48. K₂FP9 formülüne ait DSC termogramları (a: SAME, b: FP9, c: K₂FP9, d: Pharmacoat 606, e: PEG 6000, f: Fonksiyonel kaplama dispersiyonu, g: K₂FP9 fiziksel karışımı, h: inert pellet).



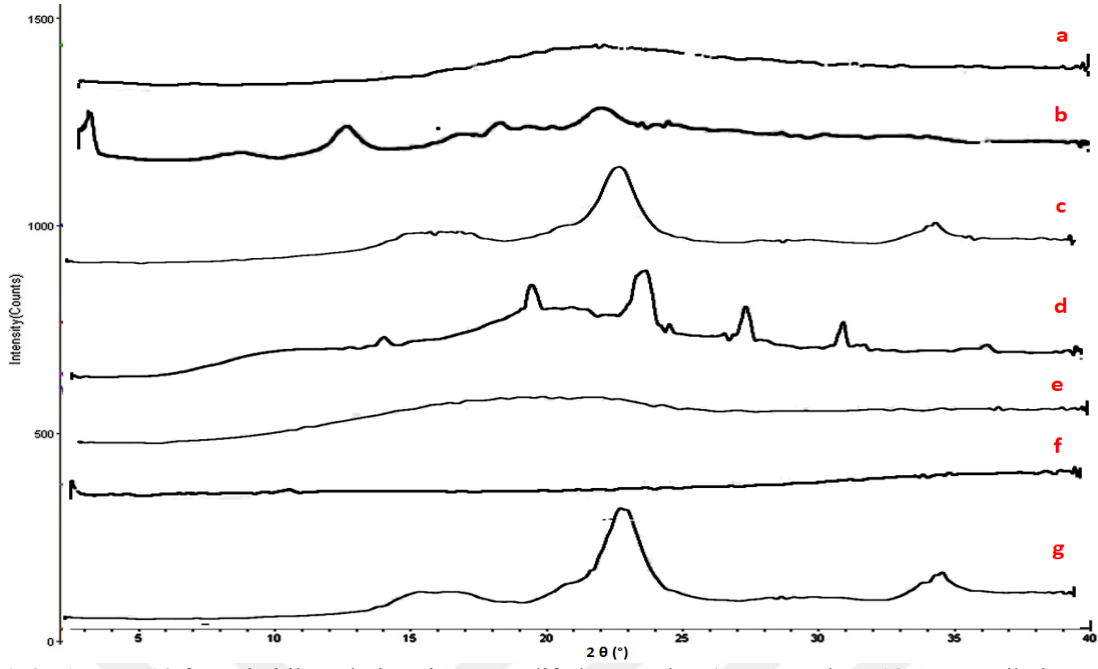
Şekil 3.49. K₂FI18 formülüne ait DSC termogramı (a: SAME, b: FI18, c: K₂FI18, d: Pharmacoat 606, e: PEG6000, f: Fonksiyonel kaplama dispersiyonu , g: K218 fiziksel karışımı h: İnert pellet)

X ışını Difraktometrisi

X ışını difraktometrisi Bölüm 2.10.4'te belirtildiği şekilde yapılmıştır. Difraktogramlar Şekil 3.50-3.51'xe belirtilmiştir.



Şekil 3.50. K₂FP9 formülü bileşenlerine ait X ışını difraktogramları (a: SAME, b: FP9 nanoparticülü, c: K₂FP9 pelletleri, d: Alt kaplama fiziksel karışım, e: Fonksiyonel kaplama formülü, f: K₂FP9 fiziksel karışımı, g: inert pellet).



Şekil 3.51. K₂FI18 formülü bileşenlerine ait X ışını difraktogramları (a: SAMe, b: FI18 nanopartikül, c: K₂FI18 pellet, d: Alt kaplama fiziksel karışım, e: Fonksiyonel kaplama formülü, f: K₂FI18 fiziksel karışımı, g: inert pellet).

3.6.4. Nanopartiküller, Kaplanmış Pelletlerde Stabilité Çalışmalarının Bulguları

Stabilité çalışmaları nanopartiküllerde Bölüm 2.9.3 ve kaplanmış pelletlerde ise Bölüm 2.10.5'te belirtildiği şekilde yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.31 – 3.35'te verilmektedir.

Çizelge 3.31. FP9 formülüne ait stabilite bulguları (YE: Yükleme etkinliği; EMİ: Etkin madde

	Başlangıç	5±3°C 1.ay	5±3°C 3.ay	5±3°C 6.ay	25±2°C 1.ay	25±2°C 3.ay	25±2°C 6.ay
FP9 (cam flakon içinde saklanan nanopartiküller)							
% YE	41,34±1,61	24,35±0,41	12,52±0,17	2,42±0,11	6,34±0,6104	1,09±0,15	0,38±0,01
% EMİ	5,39±0,21	3,16±0,07	1,59±0,05	0,32±0,02	0,83±0,0764	0,14±0,08	0,05±0,01
% S,S izomeri	60,85±0,09	57,23±0,13	57,24±1,16	54,04±0,77	51,57±0,4686	53,40±0,9779	60,80±5,66
% R,S izomeri	39,15±0,09	42,77±0,13	42,76±1,16	45,96±0,77	48,43±0,4686	46,59±0,9779	39,20±5,66
Partikül Büyüklüğü (nm) (n=6)	294,7±28,99	314,0±32,02	306,5±10,15	308,0±26,53	315,9±4,653	409,7±17,02	503,3±21,31
PDI	0,443±0,022	0,440±0,067	0,426±0,057	0,511±0,042	0,380±0,023	0,557±0,070	0,595±0,076
Zeta Potansiyel (mV)(n=3)	-19,10±1,160	-20,6±0,8902	-19,6±0,52	-25,5±0,5	-14,7±3,02	-19,5±1,46	-23,7±0,38
FP9* (vakumlu cam flakon içinde saklanan nanopartiküller)							
% YE	33,64±3,07	29,12±2,54	12,44±0,69	6,24±0,444	15,40±1,53	11,49±0,69	3,06±0,35
% EMİ	4,38±0,40	3,80±0,33	1,62±0,09	0,815±0,06	2,01±0,20	1,50±0,09	0,40±0,04
% S,S izomeri	49,68±1,24	47,71±0,82	45,22±1,19	40,75±1,35	47,96±0,68	46,52±1,49	42,10±0,78
% R,S izomeri	50,30±2,22	52,29±0,82	54,78±0,71	59,75±1,35	52,04±0,68	53,48±1,49	57,90±0,78
Partikül Büyüklüğü (nm) (n=6)	309,8±22,16	300,5±9,43	297,4±12,34	348,3 ±44,86	335,2±10,16	305,7±10,44	321,9±19,26
PDI	0,603±0,034	0,417±0,026	0,504±0,03	0,627±0,104	0,542±0,046	0,449±0,02	0,491±0,07
Zeta Potansiyel (mV) (n=3)	-20,0±1,29	-20,9±1,95	-19,5±1,03	6,24±0,444	-20,3±0,35	-19,8±0,31	-6,78±0,885
Farklı koşullardaki FP9 formülünün % Etkin Madde İçeriğinin % Değişimi							
% EMİ Değişimi-FP9	100	58,42	29,51	14,61	15,21	2,6	0,9
% EMİ Değişimi-FP9*	100	86,76	36,99	18,61	45,89	34,24	9,1

Çizelge 3.32. FI18 formülü stabilite sonuçları

	Başlangıç	5±3°C 1.ay	5±3°C 3.ay	5±3°C 6.ay	25±2°C 1.ay	25±2°C 3.ay	25±2°C 6.ay
% YE	92,38±8,95	95,73±3,79	85,11±2,46	96,41±3,28	97,94±0,72	84,68±24,28	78,72±4,97
% EMI	12,84±1,24	12,49±0,70	11,83±0,34	12,81±0,61	12,77±1,16	11,77±3,37	10,27±0,53
% S,S izomeri	57,10±0,23	54,30±0,18	55,02±0,79	52,02±0,25	52,10±0,58	51,41±2,31	47,98±0,25
% R,S izomeri	42,90±0,23	45,70±0,18	51,41±2,31	49,58±0,28	47,90±0,58	48,59±2,31	50,42±0,28
Partikül Büyüklüğü (nm)(n=6)	301,0±16,27	301,5±22,72	331,20±2,97	306,8±13,03	298,5±7,94	326,40±11,61	480,00 ±16,89
PDI	0,441±0,013	0,458±0,012	0,392±0,02	0,541±0,02	0,476±0,021	0,455±0,04	0,431±0,014
Zeta Potansiyel (mV) (n=3)	-16,70±1,24	-19,10±1,10	-18,10±1,24	-17,40±0,48	-19,70±1,90	-20,60±1,31	-18,40±1,96
% EMI Değişimi	100	97,27	92,13	99,77	99,45	91,66	79,98

Çizelge 3.33. %14 oranında fonksiyonel kaplanmış saf SAME'nin stabilite sonuçları

	Başlangıç	5±3°C 1.ay	5±3°C 3.ay	5±3°C 6.ay	25±2°C 1.ay	25±2°C 3.ay	25±2°C 6.ay
%EMI	0,26±0,009	0,26±0,01	0,32±0,08	0,13±0,03	0,24±0,01	0,29±0,02	0,06±0,006
% S,S izomeri	54,8±2,22	50,06±1,60	49,09±4,01	44,99±1,42	51,47±0,10	48,64±0,36	45,24±1,06
% R,S izomeri	45,2±2,22	49,94±1,60	50,91±4,01	55,00±1,42	48,53±0,10	51,36±0,36	54,76±1,06
% EMI Değişimi	100,0	100,0	123,0	50,0	92,0	111,5	23,1

Çizelge 3.34. İnülin nanopartikülleri ile hazırlanan K₂FP9 kodlu pellet formülünün stabilite sonuçları

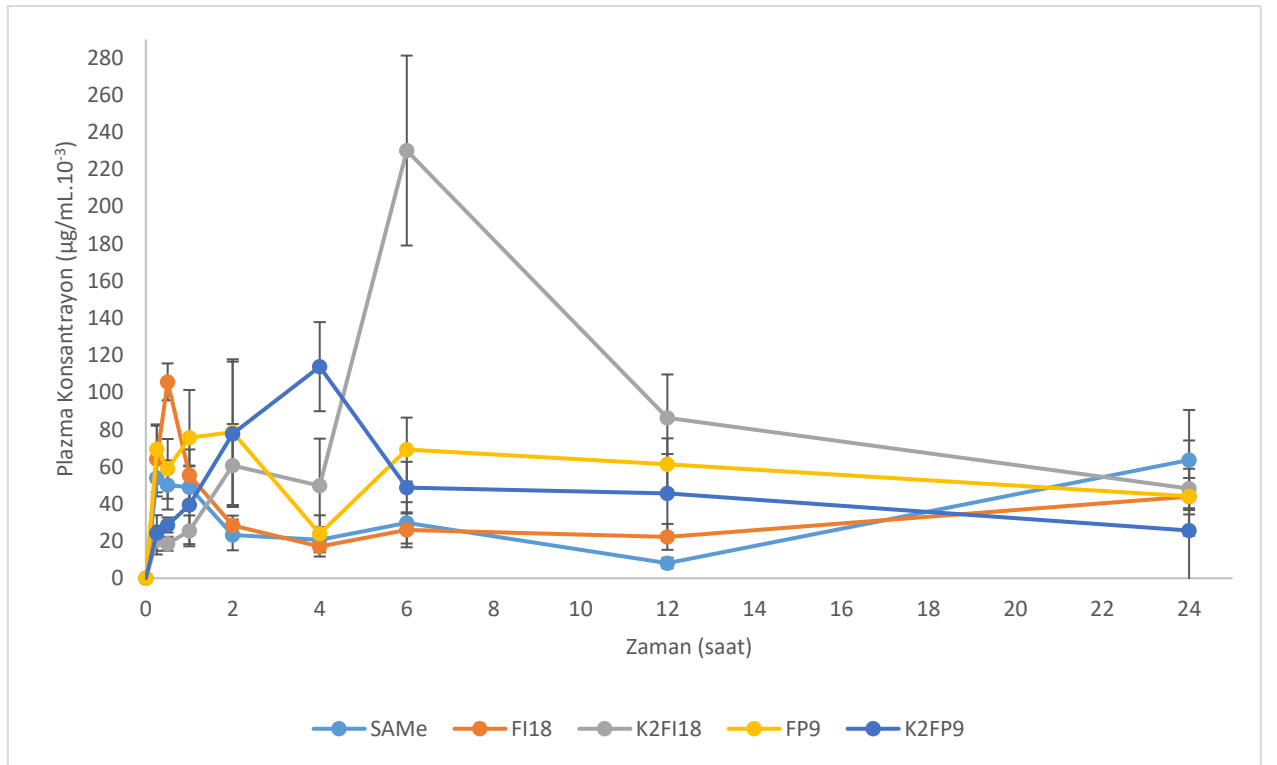
	Başlangıç	5±3°C 3.ay	5±3°C 6.ay	25±2°C 3.ay	25±2°C 6.ay
%EMİ	0,32±0,013	0,22±0,03	0,23±0,02	0,21±0,02	0,11±0,04
% S,S izomeri	60,16±0,47	50,12±1,55	50,82±2,02	51,14±0,99	41,32±2,11
% R,S izomeri	39,83±0,47	49,88±1,55	49,88±2,02	48,86±0,99	58,86±2,11
%EMİ Değişimi	100	68,8	71,9	65,6	34,4

Çizelge 3.35. İnülin nanopartikülleri ile hazırlanan K₂FI18 kodlu pellet formülünün stabilite sonuçları

	Başlangıç	5±3°C 3.ay	5±3°C 6.ay	25±2°C 3.ay	25±2°C 6.ay
% DL	1,26±0,10	1,06±0,12	1,24±0,36	0,99±0,02	0,75±0,05
% S,S izomeri	68,93±0,57	54,34±0,55	50,42±2,75	55,9±0,43	45,9±2,81
% R,S izomeri	31,06±0,57	45,66±0,55	49,58±2,75	44,1±0,43	54,1±2,81
%EMİ Değişimi	100	84,1	98,4	78,6	59,5

3.7.SAMe Yüklü Formülasyonların İn Vivo Etkinliğine Ait Bulgular

İn vitro karakterizasyon çalışmaları sonrasında en uygun olduğu belirlenen FP9 ve FI18 formülasyonları ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kaplanmış formlarının in vivo performansı SAMe çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak ratlarda incelenmiştir (Bölüm 2.11). Oral yolla veriliştikten sonra belirlenen plazma konsantrasyonu – zaman eğrileri Şekil 3.52’de görülmektedir. Hesaplanan farmakokinetik veriler (Kinetica Software) ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 3.36, 3.37, 3.38, 3.39’da verilmektedir.



Şekil 3.52. SAMe çözeltisi ve formülasyonlarının plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri.

Çizelge 3.36. Farklı formülasyonlardan herbir zaman noktasında SAME plazma konsantrasyonlarının - $\mu\text{g/ml} \times 10^{-3} (\pm \text{SH})$ karşılaştırılması.

Örnekleme zamanı (saat)	Uygulanan formüller ve (kodları)				
	SAMe (1)	FI18 (2)	FP9 (3)	K₂FI18 (4)	K₂FP9(5)
0,25	53,98 (9,93)	64,17 (17,91)	69,38 (13,4)	20,55 (7,77)	24,38 (9,58)
0,5	50,21 (13,22)	105,7 (9,94)	58,87 (16,08)	18,60 (3,74)	28,66 (4,07)
1	48,93 (11,30)	55,47 (13,87)	75,59 (25,74)	25,50 (8,32)	39,51 (21,14)
2	23,30 (8,26)	28,41 (5,31)	78,64 (39,21)	60,67 (22,32)	77,70 (38,89)
4	20,75 (6,79)	17,10 (5,40)	24,02 (9,88)	49,84 (25,3)	113,9 (23,98)
6	29,83 (11,13)	26,09 (9,41)	69,26 (17,2)	230,2 (51,1)	48,77 (13,92)
12	8,20 (2,82)	22,28 (6,98)	61,35 (13,94)	86,36 (23,33)	45,66 (21,18)
24	63,64 (26,93)	44,02 (21,13)	44,17 (9,82)	48,31 (10,62)	25,70 (48,46)
P değerleri					
Zaman (saat)	0, 5	4	6		
İstatistiksel olarak önemli düzeyde farklı formüllerin sayı kodları	2-1: 0,020*	5-1: 0,041*	4-1: 0,000***		* P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.001
	2-5: 0.000***	5-2: 0,012*	4-2: 0,000***		
	2-6: 0.002**		4-3: 0,004**		
	2-7: 0.000***		4-4: 0,000***		
			4-6: 0,000***		
			4-7: 0,000***		

Çizelge 3.37. Farklı formülasyonlardan SAME'nin maksimum plazma konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

	Maksimum plazma konsantrasyonları, $C_{\text{max}} \times 10^{-3}, \mu\text{g/mL}$				
(N=6)	SAMe	FI18	FP9	K₂FI18	K₂FP9
	58,01	124,5	114,7	115,4	115,9
	82,09	118,5	173,5	133,2	221,0
	85,86	130,2	89,90	170,6	106,7
	143,2	143,3	84,12	389,3	195,8
	87,61	115,7	175,4	292,8	162,4
	87,61	111,5	85,13	220,1	306,0
Ortalama	90,74	124,0	120,5	220,2	184,6
SH	11,47	4,712	17,67	42,78	30,26
AL (%95 GA)	61,26	111,8	75,04	110,3	106,9
ÜL (%95 GA)	120,21	136,1	165,9	330,2	262,4
P değerleri					
SAMe	-	0,960	0,977	0,011*	0,127
FI18	0,960	-	1,000	0,110	0,590
FP9	0,977	1,000	-	0,089	0,526
K₂FI18	0,011*	0,110	0,089	-	0,945
K₂FP9	0,127	0,590	0,526	0,945	-
* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001					

*C_{max} değeri herbir gruptaki deneklerin ayrı ayrı C_{max} değerinin ortalamasıdır.

Çizelge 3.38. Farklı formülasyonlardan herbir zaman noktasında SAME biyoyararlanımlarının karşılaştırılması.

	AUC _(0-t) x10 ⁻³ , (µg/mL/saat)				
(N=6)	SAMe	FI18	FP9	K ₂ FI18	K ₂ FP9
	243,6	521,2	112,5	1842	1431
	807,9	835,9	255,0	1285	825,9
	19,40	95,69	1400	2412	636,3
	1014	1420	1521	2358	548,9
	500,1	562,1	1814	1975	2369
	540,0	593,2	657,9	2084	2326
Ortalama	520,9	671,4	959,7	1992	1356
SH	147,8	178,8	291,1	167,5	337,8
AL (%95 GA)	141,0	211,6	211,3	1562	487,9
ÜL (%95 GA)	900,8	1131	1708	2423	2224
P değerleri					
SAMe	-	0,999	0,862	0,003**	0,224
FI18	0,999	-	0,980	0,009**	0,446
FP9	0,862	0,980	-	0,069	0,909
FYD6	0,666	0,892	1,000	0,150	0,985
K₂FI18	0,003**	0,009**	0,069	-	0,533
K₂FP9	0,224	0,446	0,909	0,533	-
* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001					

Çizelge 3.39. Farklı formülasyonlardan SAME T_{max} değerlerinin karşılaştırılması.

(N=6)	SAMe (1)	FI18 (2)	FP9 (3)	K ₂ FI18 (5)	K ₂ FP9(6)
	1	0,5	0,25	6	12
	0,25	0,25	2	6	2
	0,25	0,5	12	12	4
	24	24	0,5	6	4
	0,5	0,5	2	6	4
	1	1	0,5	6	24
Ortalama	4,50	4,46	2,88	7	8,33
SH	3,90	3,91	1,85	1,88	1,00
AL (%95 GA)	-5,53	-5,59	-1,89	4,43	-0,51
ÜL (%95 GA)	14,53	14,51	7,64	9,57	17,18
P değerleri					
SAMe (1)	-	1,000	0,999	0,994	
FI18 (2)	1,000	-	1,000	0,993	
FP9 (3)	0,999	1,000	-	0,928	0,778
K₂FP9 (4)	0,948	0,946	0,778	1,000	-
K₂FI18 (5)	0,994	0,993	0,928	-	1,000

4. TARTIŞMA

Tez çalışmasında oral yolla verilişte stabil olmaması, düşük permeabilitesi ve karaciğerde ilk geçiş etkisine uğraması nedeniyle düşük biyoyararlanıma sahip SAME'nin biyoyararlanımını artırmak için farklı formülasyon yaklaşımlarının araştırılması ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır. SAME'nin oral verilişte mutlak biyoyararlanımı %1 civarındadır. İ.M. verilişte mutlak biyoyararlanımı %80-90 olarak bulunmuştur (García-Trevijano ve ark., 2000; Macdonald ve ark., 2011; McMillan ve ark., 2005).

SAME, yapısındaki sülfonyumdan dolayı instabilite problemleri göstermektedir (Şekil 4.1). Bundan dolayı SAME, çeşitli büyük anyonik gruplarla tuzları oluşturularak daha stabil formları haline getirilmiştir. Bunlar arasında SAME'nin 1,4-bütandisülfonat, disülfat ditosilat, disülfat monotosilat, disülfat tosilat, tosilat (p-toluensülfonat) oldukça stabil olduğu kabul edilen tuzlardır (Deshpande., 2001; Fiecchi, 1975; Gennari, 1984; Morana ve ark., 2000). Bottiglieri, farmasötik formülasyonlarda kullanılan stabil tuz formları arasında toluendisülfonat ve 1,4-bütandisülfonat tuzunun en stabil olduğunu belirtmiştir. Ayrıca birçok klinik çalışmada da 1,4-bütandisülfonat tuzu kullanıldığından tez çalışmamızda SAME'nin 1,4-bütandisülfonat tuzu kullanılmıştır (Bottiglieri, 2002; Delle Chiaie ve ark., 2002).

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

4.1.1.SAME'nin Su Ortamındaki HPLC Analizi

SAME'nin su, SGF, SCoF1 ve SCoF2 ortamlarında maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyları ($\lambda_{\max}$) belirlenmiştir. HPLC cihazında tüm ortamlarda $\lambda_{\max} = 260$ nm (Şekil 3.1) olup bu veriler literatür verileriyle uyum göstermektedir (Cannon, 2002).

HPLC’de SAME miktar tayini yöntemi geliştirilirken etkin maddenin diastereoizomerlerinin ve degradasyon ürünlerinin ayırdedebilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla literatürde kapiler elektroforez, enzime dayalı spektrofotometrik tayin, LC/MS ve HPLC gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır (Cannon, 2002; Desiderio ve ark., 2005; Krijt ve ark., 2009; Zhang ve Klinman, 2015). Diastereoizomerik ayırım için kiral kolonlar da mevcut olmasına rağmen Zhang ve Klinman (2015), HPLC ile ayırımı başarmışlardır (Zhang ve Klinman, 2015). Araştırmacıların kullandığı analitik yöntem bu tez çalışmasında referans olarak alınmıştır. Bu çalışmada 50 mM amonyum format tamponu (pH 4.0), 50 mM %1 trifloroasetik asit (TFA) içeren amonyum asetat tamponu (pH 5.4), 10 mM fosfat tamponu (pH 6.8) olmak üzere üç ayrı mobil faz, C18 ters faz analitik kolon (Kinetex, 5 μ m, 100 Å, 250 4.6 mm, Phenomenex) kullanılarak akış hızı 1 ml/dk akış hızında ve 257 nm’de, analiz yürütülmüştür. Diastereoizomer ayırımı 50 mM %1 trifloroasetik asit (TFA) içeren amonyum asetat tamponu (pH 5.4) kullanılan analiz yönteminde başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple tez çalışmamızda bu yöntem kullanılarak izomer ayırımı gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1) . Şekil 3.2’de görüldüğü gibi literatür ile uyumlu bir biçimde SAME’nin izomerik ayırımı sağlanmıştır. Belirtilen koşullar altında farklı konsantrasyondaki çözeltilerle yapılan analizler sonucunda SAME’nin su ortamında standart doğrusu oluşturulmuştur; standart doğru denklemi için determinasyon katsayısı (r^2) 1.000 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.3). Diğer ortamlar içinde yapılan deneyler için bu standart doğru denklemini kullanılmıştır.

4.1.2. SAME’nin Su, SGF ve ScoF2 Ortamlarında UV Spektrofotometrisi Analizi

SAME’nin UV spektrofotometrede $\lambda_{\text{max-su}} = 260$ nm, $\lambda_{\text{max-SGF}} = 257$ nm, $\lambda_{\text{max-Scof2}} = 259$ nm (Şekil 3.4) olarak bulunmuştur. Bu veriler literatür verileriyle uyum göstermektedir (Cannon, 2002). Bulunan λ_{max} ’ta farklı konsantrasyondaki çözeltilerle yapılan analizler sonucu standart doğrular çizilmiştir (Şekil 3.5-3.7). Standart doğru denklemi için determinasyon katsayısı (r^2) 1.000 olarak hesaplanmıştır.

4.1.3.SAMe'nin Plazma Ortamındaki HPLC Analizi

İn vitro yöntemler belirlendikten sonra plazmada miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir. İn vitro yöntemin aksine in vivo miktar tayin yönteminde yüksek LOQ (86,16 ng/ml) değerinden dolayı diastereoizomerlerin kromatografik ayırımı yapılmamıştır. Bunun yerine birçok çalışmada kullanılan analitik yöntem üzerinde modifikasyonlar yapılarak miktar tayin yöntemi geliştirilmiştir (Poirier ve ark., 2001). Plazma içinde SAMe tayini için ekstraksiyon yöntemi Şekil 2.1'de verilmiştir. SAMe'nin HPLC analizinde plazma ortamda 200-400 nm aralığında alınan 3D spektrumunda, maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu $\lambda_{\text{max-su}} = 260$ nm olarak bulunmuştur (Şekil 3.8). Bu veriler literatür verileriyle uyum göstermektedir (Cannon, 2002).

Plazma örneklerine ait kromatogram SAMe'nin aynı koşullarda su ortamındaki numunelerinden elde edilen kromatogramı ile karşılaştırılmış ve alıkonma zamanlarının aynı olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.9). Çizelge 3.2'de görülen koşullar altında plazma numunelerinde artan SAMe konsantrasyonu ile pik boylarındaki düzenli artış Şekil 3.10'da görülmektedir. Bu bulgu SAMe'nin plazma ortamından başarıyla ekstrakte edildiğini ve kullanılan analitik yöntem ile etkin maddenin teşhis ve tayin edilebildiğini göstermektedir. SAMe'nin plazma ortamında ekstraksiyonla hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltilerinin ölçümünden oluşturulan standart doğruları Şekil 3.11'de gösterilmiştir ($r^2 = 0,9990$).

4.2.SAMe'nin Miktar Tayini Yöntemlerinin Analitik Validasyonlarına İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Geliştirilen analitik yöntemlerin validasyonu için doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik), teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) incelenmiştir. Bunların yanında HPLC cihazında uygunluk testleri yapılmıştır. Bu parametrelerin değerlendirilmesinde kullanılan kabul kriterleri resmi kılavuzlar, kitaplar ve bilimsel çalışmalar referans alınarak belirlenmiştir (Özkan ve ark., 2011; Food and Drug Administration, 2019; European Medicines Agency, 2018; Shabir, 2004; Center for Drug Evaluation and Research, 2019; International Center of Harmonization, 2018).

Doğrusallık ve aralığı çalışmaları ICH kılavuzuna göre minimum 5 noktada ölçüm yapılması gerektiği belirtilmiştir. Ölçümler en az 3 kere okunarak standart sapma ve bağıl standart sapmaları hesaplanmaktadır. Çizelge 2.1’de belirtilen analitik validasyon uygulama koşullarında, HPLC cihazı ile elde edilen SAME’ye ait standart doğrunun doğrusallık ve aralığı ile istatistik verileri Çizelge 3.3’te; spektrofotometri ile elde edilen standart doğruların doğrusallık ve aralığı ile standart doğrusuna ait istatistikler Çizelge 3.4’te verilmiştir. Elde edilen standart doğru denklemlerinin eğim ve kesişimleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Determinasyon katsayıları, r^2 değerleri 0,9990 üzerindedir (Food and Drug Administration, 2019). Bu veriler, okunan absorbanslardan veya alanlardan hesaplanan konsantrasyon değerlerinin güvenilir olduğunu göstermektedir. HPLC ile elde edilen plazma içindeki SAME’ye ait standart doğrunun doğrusallık ve aralığı ile istatistik verileri Çizelge 3.5’te verilmiştir. Elde edilen standart doğru denklemlerinin eğimi istatistiksel olarak önemli iken kesişim değeri =’dan önemli derecede farklı değildir. Determinasyon katsayısı, r^2 değeri 0,9994’tür.

UV spektrofotometre ve HPLC’de yapılan doğruluk ve geri elde işlemleri Bölüm 2.5, Çizelge 2.1’de belirtildiği şekilde yapılmıştır ve sonuçlar Çizelge 3.6’da verilmiştir. İlgili ICH kılavuzunda, bu testler için en az 3 farklı derişimden 3 tekrarlı okuma yapılmasını önermektedir. Seçilen konsantrasyonlar yüksek, orta ve düşük olmak üzere belirlenmiştir. Eğer doğrusallık ve aralığının belirlenmesi sırasında yapılyorsa 5 farklı derişimden yapılması önerilmektedir. SAME’nin HPLC’de ve UV’de yapılan miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri elde çalışmaları sonuçları literatürlerde belirtilen parametrelere göre değerlendirilmiştir. Buna göre geri elde yüzde limitleri %97 ile %103 arasında olmalı ve BSS < % 2 olmalıdır. Fakat biyolojik numunelerde böyle bir zorunluluk bulunmamaktadır (Shabir, 2004). Yapılan tüm doğruluk ve geri elde çalışmalarının sonuçları ve bu sonuçların bağıl standart sapmaları bu limitlere uymaktadır.

SAME’nin kesinlik çalışmaları kapsamında tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışmaları Bölüm 2.5’te, Çizelge 2.1’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmalarında otoritelere göre analizi yapılacak konsantrasyonda çözelti hazırlanır. En az 10 ölçüm alınır. Tekrarlanabilirlik tayini için gün içi olarak tekrarlı okumalar neticesinde

elde edilen % BSS 1'den küçük olmalıdır (Özkan ve ark., 2011). Bu bakımdan çalışmamızda HPLC ile UV spektrofotometre ile yapılan miktar tayinlerinin tekrarlanabilirlik sonuçları literatürlerde verilen kabul kriterlerine uymaktadır. Tekrarlanabilirlik sonuçlarının % bağıl standart sapmaları, kabul kriteri olan %1'den küçüktür (Çizelge 3.7). Plazma içindeki SAME'nin tekrarlanabilirlik tayininde bulunan % bağıl standart sapma değeri 2.713'tür (Çizelge 3.7). Biyolojik numuneler için bu değer % 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

Ara kesinlik çalışmaları farklı gün ve farklı analistler tarafından yapılmıştır. HPLC ve UV spektrofotometre ile yapılan miktar tayinlerinin ara kesinlik sonuçları literatürlerde verilen kabul kriterlerine uymaktadır (Çizelge 3.7). Tüm tekrarlanabilirlik sonuçlarının % bağıl standart sapmaları kriter olan % 2'den küçüktür. Plazmada SAME tayini için ara kesinlik çalışmaları kapsamında günlerarası fark incelenmiştir. HPLC ile yapılan miktar tayinlerinin ara kesinlik sonuçları literatürlerde verilen kabul kriterlerine uymaktadır. İn vitro yöntemler için % BSS ≤ 2 olmalıdır, fakat biyolojik numuneler için bu değer % 10-15'e kadar çıkabilir. Yapılan ara kesinlik tayininde bulunan % bağıl standart sapma değeri 2,837 ve 1,212'dir (Çizelge 3.7).

UV spektrofotometri ve HPLC ile teşhis ve tayin sınırları Bölüm 2.5'te belirtildiği şekilde doğrusallık ve aralığındaki en düşük konsantrasyona karşılık ölçümlerin standart sapması - eğim ile hesaplama yöntemi ile Eşitlik 4 ve 5'ye göre hesaplanmıştır. HPLC yönteminde teşhis ve tayin sınırları, UV spektrofotometriye göre daha düşük değerlerdir. HPLC, UV'den daha hassas olduğundan dolayı bu durum beklenmektedir (Çizelge 3.8).

FDA ve USP tarafından kromatografik analizlerde önerilen sistem uygunluk testleri HPLC analizlerinin doğruluğunu ispatlamak amacıyla yapılmıştır. Bu kapsamda yapılan uygunluk testlerinin kabul edilmesi için $BSS_{\text{tekrarlanabilirlik}} < 1$, teorik plaka sayısı > 5000 ve kuyruklanma faktörü < 2 olmalıdır (Shabir, 2004). HPLC'den elde ettiğimiz sonuçlara göre kolon verimini gösteren teorik plaka sayısı, pikin simetrikliğini gösteren kuyruklanma faktörü belirtilen kriterlere uymaktadır (Çizelge 3.9).

SAMe'nin Stabilitesi

Bölüm 2.5'te belirtildiği gibi SAMe'nin, stabilite açısından gözönüne alınması gereken önemli yönleri yüksek kimyasal instabilite, diastereoizomerizm, alkali duyarlılığı, oksidasyon ve termal degradasyondur. Bu nedenlerden kaynaklı stabilite sorunlarında SAMe'nin S,S:R,S formlarının oranlarında değişimler görülmektedir.

Desiderio ve ark.. (2005), yapmış oldukları çalışmada, SAMe 1,4-bütandisülfonat ve mannitol içeren enjeksiyonluk Samyr® müstahzarını kullanarak kapiler elektroforezle miktar tayini ve stabilite çalışmalarını yürütmüşlerdir (Desiderio ve ark., 2005). SAMe'nin sulu çözeltisi (5 ml, 50 mM), $25\pm 2^\circ\text{C}$ 'de 3 gün bekletilerek SAMe, SAMe diastereoizomerleri ve degradasyon ürün (bileşik 1 ve 2) içerikleri belirlenmiştir. Buna göre SAMe konsantrasyonları % 95.15'ten 86.31'e kadar düşmüş; S,S/R,S oranı da 1,63 'ten 1,45'e düşmüştür. Doğal bir sonuç olarak degradasyon ürünlerinin miktarlarında da artış görülmüştür. SAMe sulu çözeltisinin 38°C 'de 14 gün süre ile inkübasyonu sırasında; 7. ve 14. günlerde SAMe içeriği başlangıç değerine göre sırasıyla % 51.7 ve % 32.3 oranında azalırken, S,S ve R,S diastereoizomerleri 61:39 başlangıç oranından neredeyse rasemik bir karışım şeklinde sabit bir değere ulaşmıştır. Özellikle S,S formunun daha yüksek derecede degradasyona uğradığı gözlenmiştir. Magesh ve ark. (2012), SAMe ve impüritelerinin miktar tayinlerini ters faz HPLC yöntemiyle yaparak çeşitli stres koşullarında stabilite incelemesi yapmışlardır. SAMe'nin özellikle alkali hidrolize ve oksidasyona duyarlılığı gösterilmiştir.

Parks ve Schlenk (1958), SAMe'nin stabilitesi ve hidrolizi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada SAMe, koruyucu olarak toluen ilave edilen $0.05\ \mu\text{M}$ /ml fosfat tamponu içinde, 30°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. SAMe'nin verilen hidrolitik ürünleri olarak 5'-metiltiyoadenozin, adenin, homoserin ve metiyonin oluşumu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra SAMe degradasyonuna bağlı olarak sülfonyum konfigürasyonunun bozulması asitlik derecesinde de artışa neden olmuştur. Vezmar, (2005)'in tez çalışmasında SAMe ve S-adenozinhomosistein'in (SAH) değişik pH'lara sahip ortamlarda, 37°C 'de, 48 saat süre ile stabiliteleri değerlendirilmiş; pH 1'den 10'a doğru artışta SAMe miktarının % 100'den sıfıra düştüğü gözlenmiştir.

Tüm bu çalışmalar, miktar tayini yanısıra formülasyonların geliştirilmesi sırasında SAME'nin stabilitesi açısından dikkat edilmesi gereken noktaları göstermiştir. Bölüm 2.5'te belirtilen HPLC ile yapılan stabilite çalışmalarında SAME'nin aktif olan S,S diastereoizomeri incelenmiştir. Sıcakta bozunduğu bilinen SAME'nin, tahmin edildiği gibi ortamın sıcaklığı arttıkça aktif formunda belirgin bir düşüş görülmüştür (Çizelge 3.10).

İn vitro etkin madde salım çalışmalarında kullanmak üzere kolonu temsil edebilecek çözünme ortamını belirlemek amacıyla iki farklı çözünme ortamı (SCoF1 ve SCoF2) seçilmiş (Bölüm 2.3) ve bu ortamlarda SAME'nin stabilitesi incelenmiştir. Şekil 3.12 incelendiğinde SAME'nin SCoF2'de SCoF1'e göre daha stabil olduğu görülmüştür. Bunun SCoF2'nin pH'sının (pH 5.8) SCoF1'e göre (pH 7.0) daha düşük olmasına bağlanmıştır. SCoF2, etkin maddenin bu ortamda daha yüksek stabilite göstermesi nedeniyle salım ortamı olarak seçilmiştir. Alkali hassasiyeti olduğu bilinen SAME, beklenildiği gibi pH'sı düşük suni mide ortamında en stabil kalmıştır. SAME'nin asidik ortamda dayanıklı olmasının, düşük pH'larda yüzey yükünün fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sayede stabilitesini koruduğu düşünülmektedir. Şekil 3.12 incelendiğinde 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonucu S,S diastereoizomerinde düşüş görülmüştür. Buradan elde edilen sonuçlara göre yöntem seçerken yüksek sıcaklık ve/veya alkali ortam gerektirmemesi göz önünde tutulmuştur.

UV spektrofotometre ile yapılan stabilite çalışmaları Bölüm 2.5'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kolon ortamı olarak HPLC ile belirlenen SCoF2 ortamı kullanılmıştır. UV spektrofotometrisi ile 24 saat boyunca yapılan stabilite çalışmasında SAME'nin konsantrasyonunda S,S+R,S olmak üzere belirgin bir düşüş görülmemiştir (Şekil 3.13). Bunun sebebi spektrofotometrik tayinde iki diastereoizomerin ayıramaması ve aynı λ_{max} 'da birlikte pik vermesidir.

4.3.Etkin Maddenin Piyasa Preparatının Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Elimizdeki etkin madde ile piyasa preparatının S,S ve R,S miktar tayini incelemesi Bölüm 2.6'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. Bölüm 3.3'teki sonuçlara göre piyasa

preparatının S,S yüzdesi (% 52,7) elimizdeki etkin maddeye (% 77,45) göre daha düşüktür (Çizelge 3.11). Bununla birlikte, SAME'nin instabilitesi gözönüne alındığında halen yüksek bir değerdir; ürünün stabilitesi açısından primer ambalajının çok iyi seçildiğini göstermektedir. Ürünün ambalajı hava, nem, oksijen geçişini önleyecek şekilde alüminyum kaplı blisterdir.

4.4. Formülasyon Çalışmalarına İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

4.4.1. Kitozan Nanopartikül Formülasyonları

Biyolojik olarak uyumlu, biyoparçalanır olabilen ve birçok farklı etkin maddeyi taşıyabilen kitozan, nanopartiküler sistemlerde en çok rağbet gören polimerlerdendir. Sahip olduğu pozitif yükten dolayı elektrostatik etkileşime olanak vermekte ve negatif yüklü membranlar ile kompleks oluşturarak mukoadeziv özellik kazanmaktadır.

Kitozan nanopartiküllerine ait bulgular Bölüm 3.4.1'de verilmiştir. Kitozan nanopartiküllerinin üretiminde en çok kullanılan iyonik jelasyon yöntemi, yöntemin basitliği, uygulama kolaylığı ve $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilebilmesi nedeniyle tercih edilmiştir. Formülasyonlar oluşturulurken hacimler sabit tutularak farklı konsantrasyonlarda kitozan, Na-TPP ve SAME çözeltileri kullanılmıştır (Çizelge 2.3). Bunların dışındaki parametreler (karıştırma hızı ve süresi, santrifüj koşulları) sabit tutulmuştur. Ön çalışmalarla belirlenen konsantrasyonlar gözönünde tutularak formülasyon değişkenleri belirlenmiştir. Bu bağımsız değişkenlerin, nanopartiküllerin özellikleri, partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, % etkin madde yükleme etkinliği ve işlem verimi parametrelerine etkisi çoklu lineer regresyon (MLR) analizi ile incelenmiştir.

Kitozan nanopartiküllerinin üretiminde kitozan çözeltisinin pH'sı iyonik jelasyonda çok önemlidir. pKa'sı yaklaşık 6.5 olan kitozanın yük yoğunluğu ortamın pH'sına göre değişmektedir. Su ve Zhu (2002) ortam pH'sının kitozanın protonasyon derecesine etkisini incelediği çalışmada pH'yı 4,7'den 8,0'e çıkardıklarında protonasyon derecesinin %100'den % 0'a indiğini gözlemlemişlerdir. En yüksek protonasyon derecesinin pH 4.7'de

olduğunu göstermişlerdir. Fan ve ark. (2012) kitozan çözeltisinin pH'sının nanopartiküller üzerindeki etkisini incelediklerinde, pH 4,5'in altında monomodal partikül büyüklüğü dağılımının olmadığını, pH 5,2'nin üstünde ise mikropartikül oluşmaya başladığını gözlemlemişlerdir. Bu verilere dayanarak çalışmamızda kullandığımız kitozan çözeltisinin pH'sı 4,7'ye ayarlanmıştır.

Kitozan nanopartiküllerinin mikroskop görüntüleri incelendiğinde küresel şekilli partiküller gözlenmiştir (Şekil 3.15). Çalışmamızda, kitozan nanopartikülleri içinde SAME'nin tutulma etkinliği düşük olmuştur (Çizelge 3.12). Yapılan MLR analizi ile 3 değişkenin de yükleme etkinliği üzerine etkisi olmadığı gösterilmiştir (Çizelge 3.13). SAME'nin sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir (1.19 mg/ml) ve taşıdığı net yük pozitifdir. SAME katyonik özelliğinden dolayı kitozan gibi katyonik etkili bir ilaç taşıyıcı sisteme düşük oranda yüklenmektedir. Bunun sebebinin elektrostatik itme olduğu düşünülmektedir. Janes ve ark. (2001), antikanser etkili katyonik ve suda çözünen bir ilaç olan doksorubisin hidroklorürü (DOX-HCl) kitozan nanopartiküllerine yüklemeye çalışmışlardır. Etkin maddenin düşük yükleme etkinliğini artırmak amacıyla kompleksleştirme yaklaşımına gidilmiştir. Bu kapsamda DOX-HCl zıt yüklü polianyonik maddelerle kompleksleştirip bu kompleks nanopartiküllere yüklenmeye çalışılmıştır. Bu işleme rağmen etkin maddenin tutulma etkinliği düşük olmuştur.

Elde edilen verilere göre üretim işlem verimi % 11,06 - 35,9 arasındadır (Çizelge 3.12). Nanopartikül oluşumu ortamdaki kitozan ve TPP'nin iyonik jelasyonu ile ilişkilidir. Ancak, jelasyona katılamayan maddeler ve suda yüksek çözünürlüğü olan etkin maddenin büyük bir kısmı çözeltide kalmaktadır. Dolayısıyla da verimin ve yükleme etkinliğinin düşük olmasına sebep olmaktadır.

Nanopartiküllerin partikül büyüklükleri ve dağılımları, Şekil 3.14'te görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre kitozan ve TPP miktarı partikül boyutu üzerine etkili değilken nanopartiküllere yüklenen SAME miktarının istatistiksel olarak önemli düzeyde etkili olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). Formülasyonlarda kitozan miktarı arttığında partikül büyüklük dağılımı bimodal olmuştur (FK5-FK8). Buna rağmen kitozan nanopartiküllerinin tamamında PDI değerleri 0,7'nin altında olmuştur (Çizelge 3.12). PDI değerinin 0,7'nin

üstünde olması durumunda geniş bir partikül büyüklüğü dağılımı olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle büyüklük dağılımının dar bir aralıkta olduğu söylenebilir (Malvern Instrument Limited, 2011).

Zeta potansiyel, partiküllerin üzerindeki elektriksel gerilimdir. Zeta potansiyel değeri arttıkça partiküller birbirini iter, agregasyon eğilimi azalır ve partiküller daha stabil bir profil çizer. Elde edilen nanopartiküllerin zeta potansiyelleri 14,1-20,7 mV arasındadır. Zeta potansiyeli kitozanın yükünden dolayı pozitifdir (Çizelge 3.12) .

Hazırlanan kitozan nanopartikül formülasyonları arasından seçilen FK5 ve FK6 nanopartikülleri en yüksek etkin madde yükleme etkinliği ve etkin madde içeriğine sahiptir (Çizelge 3.12). Bu nedenle bu formülasyonların üretiminin ve özelliklerinin tekrarlanabilirliğini incelemek için üretilen 3 serinin özellikleri karşılaştırılmıştır. Karakterizasyon parametrelerinden elde edilen % BSS değerleri kullanılarak yöntem tekrarlanabilirliği değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların BSS değerleri, Çizelge 3.14'te verilmiştir. Şekil 3.16'da nanopartiküllerin partiküllerin çap dağılımı görülmektedir. FK5 nanopartiküllerinin üretiminde partikül büyüklüğü ve dağılımı açısından yöntemin tekrarlanabilir sonuçlar verdiği (% BSS<5), ancak etkin madde içeriği ve işlem veriminin seriler arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur. F6 formülasyonunda ise karakterizasyon parametreleri tekrarlanabilir bulunmamıştır (%BSS>10). Elde edilen sonuçlar kitozan nanopartikül üretim prosesinin tekrarlanabilir olmadığını göstermiştir.

Düşük yükleme etkinliği, işlem verimi ve üretimin tekrarlanabilirliğinde görülen problemlerden dolayı kitozan nanopartikülleri için kaplama aşamasından vazgeçilerek in vivo çalışmalardan çıkarılmıştır.

4.4.2.Pektin Nanopartikül Formülasyonları

Çalışmamızda pektin nanopartiküllerinin hazırlanmasında iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılmıştır. Pektin, taşıdığı karboksil gruplarının iyonlaşması ile negatif yüklenir. Böylelikle pozitif yüklü gruplarla iyonik kompleks oluşturarak agregatlar halinde çökmektedir. Pektin hakkındaki çalışmaların büyük çoğunluğunda kullanılan yöntem iyonik

jelasyon yöntemidir. Katyon olarak başta kalsiyum klorür olmak üzere çinko klorür, magnezyum klorür gibi divalen katyonlar kullanılmaktadır (Opanasopit ve ark., 2008).

Çalışmamızda divalen çapraz bağlayıcı ajanların yükleme etkinliğine etkisini incelemek amacıyla $MgCl_2$, $MgSO_4$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve $BaCl_2$ gibi farklı divalen katyonlardan oluşan bileşikler kullanılmıştır ve formülasyonlar üçer seri olarak hazırlanmıştır (Çizelge 2.4 ve Çizelge 3.15). Genel karakterizasyon bulgularına göre serilerin tekrarlanabilirliği, kitozan nanopartiküllere göre daha yüksek bulunmuştur. Dört farklı tipte çapraz bağlayıcı ajan kullanılarak hazırlanan pektin nanopartiküllerinin (FP1-FP4) etkin madde yükleme etkinlikleri % 46,51 - 108,5 arasında değişmektedir (Çizelge 3.15). SAME katyonik bir etkin madde olduğu için anyonik yapıdaki pektin ile hazırlanan nanopartiküllere yüklenmesinin katyonik kitozanla hazırlanan partiküllere göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum SAME ve pektin arasındaki elektrostatik etkileşime bağlanmıştır. Farklı çapraz bağlayıcıların etkin madde yükleme etkinliği üzerine etkileri incelendiğinde, $MgCl_2$, ve $MgSO_4$ çapraz bağlayıcıları kullanılarak hazırlanan pektin nanopartikülleri (FP1 ve FP2) için en yüksek yükleme etkinlikleri gözlenmiştir. Ancak bu formüllerin işlem verimleri FP3 ve FP4 formüllerine göre daha düşük olmuştur. Elde edilen verilere göre üretim işlem verimi % 5,09-58,65 arasındadır. Hazırlanan nanopartiküllerde kullanılan çapraz bağlayıcıya bağlı olarak, işlem veriminin $BaCl_2 > CaCl_2 \cdot 2H_2O > MgCl_2 > MgSO_4$ sırasında azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 3.15).

Çapraz bağlayıcı olarak $BaCl_2$ 'ün kullanıldığı formülasyonlardan hazırlanan nanopartiküllerin daha küçük olduğu gözlenmiştir. Üretim kolaylığı da değerlendirilerek sonraki formülasyonlarda $BaCl_2$ 'ün çapraz bağlayıcı olarak kullanımına karar verilmiştir. Giridhar ve Pandit tarafından yapılan çalışmada farklı oranlardaki sodyum aljinat ve lignosülfonik asitten elde edilen filmler $BaCl_2$ ile çapraz bağlanmış ve dayanıklı filmler elde edilmiştir (Giridhar ve Pandit, 2013). Çalışmada $BaCl_2$ tercih etmelerinin sebebi en yaygın kullanılan $CaCl_2$ 'e göre daha güçlü çapraz bağlama kapasitesi olarak açıklanmıştır. Bizim çalışmamızda da $BaCl_2$, diğer çapraz bağlayıcılara göre yukarıda belirtilen parametreler açısından daha üstün bulunmuştur. Çapraz bağlayıcıya karar verilmesinden sonra formülasyon optimizasyonuna geçilmiş ve 2^3 düzeyli bir faktöriyel tasarım uygulanarak Çizelge 2.4'te bileşimleri verilen FP5-FP12 formülasyonları hazırlanmıştır. Pektin nanopartiküllerinin karakterizasyon bulguları MLR analizi ile değerlendirilmiştir.

Elde edilen tüm pektin nanopartikülleri için zeta potansiyel değerleri -10,9 ile -25,5 mV arasındadır (Çizelge 3.16 ve 3.17). Negatif yük pektinin üzerindeki galakturonik asit zincirlerinden gelmektedir.

Pektin miktarının % yükleme etkinliğine pozitif etkisinin artan polimer miktarına bağlı olarak hapsettiği SAME miktarıyla ilgili olduğu ($P<0,05$); $BaCl_2$ miktarının % etkin madde içeriğine negatif etkisinin SAME ile aynı yüke sahip olduğundan yarışmalı olarak azalttığı düşünülmektedir (Şekil 3.20). SAME miktarının ise % etkin madde içeriğine pozitif katkıda bulunduğu; ve yine $BaCl_2$ miktarının Weibull kinetiği zaman parametresi, τ_d değerine pozitif katkı yaparak bu değeri artırdığı, böylece SAME'nin salım hızının yavaşladığı (Şekil 3.21, Şekil 3.22) bulunmuştur ($P<0.05$) (Eşitlik 9, Çizelge 3.17).

Bu bulgulara göre FP9 nanopartikülleri, küçük partikül büyüklüğü, yüksek yükleme etkinliği ve işlem verimi ile sonuç formülasyon olarak seçilmeye uygun görülmüştür; ancak bu karar için etkin maddenin bu nanopartiküllerden salımı da değerlendirilmiştir. Pektin nanopartikülleri etkin maddenin salımını bir miktar geciktirmiştir; 1. saat sonunda saf SAME'nin %70'i çözünürken, Ba-pektinat ve Ca-pektinat nanopartiküllerinden SAME'nin sırasıyla % 59 ve 56'sı açığa çıkmıştır. Fakat iki çapraz bağlayıcı arasında belirgin bir fark görülmemiştir (Şekil 3.17). Optimizasyon çalışmaları sonucunda üretilen nanopartiküllerden etkin madde salımında da bir ani salım söz konusudur, ancak saf etkin maddeye göre salım düzeyi düşüktür. Salımı en çok yavaşlatan formüller FP7, FP8 ve FP12 olmuştur; en yüksek τ_d değerleri bu formülasyonlar için gözlenmiştir ve sırasıyla 88,09, 155 ve 178,6 dk olarak Weibull kinetiğinden hesaplanmıştır (Şekil 3.22, Çizelge 3.16, Eşitlik 9). FP8 formülünde çapraz bağlayıcı $BaCl_2$ miktarı yüksek düzeyde iken diğer iki formülde pektin miktarı yüksek düzeydedir (Çizelge 2.4). Bu bulgu ile uyumlu olarak, Sriamornsak ve ark. (2012) yüksek molekül ağırlıklı pektin kullanarak hazırladıkları pektin mikropartiküllerinden etkin madde salımının çapraz bağlayıcı olarak glutraldehit kullanılması durumunda geciktiğini göstermişlerdir. SAME'nin, nanopartiküllerin kolona bir bütün halinde ulaşmasından sonra gecikmeden salınması hedeflendiğinden, Bölüm 3.4.2'deki bulgular yanısıra uzun olmayan bir $\tau_d = 56,55$ dk değeri veren FP9 formülasyonu sonuç pektin nanopartikül formülasyonu olarak seçilmiştir. Bunun yanısıra kolon ortamında

pektinazın bu süre üzerindeki etkisini görmek için de Bölüm 2.8.5'te anlatıldığı şekilde salım testi yapılmıştır. SGF içine pepsin ve SCoF2 içine pektinaz enzimleri ilave edilmiştir. Yapılan çözünme hızı çalışmaları sonucunda FP9 nanopartiküllerinden etkin maddenin enzimli ortamda daha hızlı salındığı gözlenmiştir (Şekil 3.23). Enzimli ve enzimsiz ortamlarda elde edilen etkin madde salım profilleri f_2 benzerlik faktörü (Eşitlik 10) ile değerlendirilmiştir ve f_2 değeri 40,88 olarak hesaplanmıştır. Benzerlik için bu değerin 50-100 arasında olması gerekmektedir. Dolayısıyla, bulunan f_2 değeri iki profilin benzer olmadığını ve pektinaz enziminin etkin madde salımını belirgin şekilde etkilediğini / artırdığını göstermiştir.

SAMe'nin saf halinin ve FP9 nanopartiküllerine yüklendikten sonraki permeabilitesinin karşılaştırılması amacıyla yapılan permeabilite çalışmaları sonucunda saf etkin maddenin PAMPA permeabilite katsayısı 311×10^{-6} cm/saat iken, pektin nanopartiküllerden 3619×10^{-6} cm/saat olarak bulunmuştur (Şekil 3.24; Çizelge 3.18).. Bu şekilde permeabilite artışı, SAMe'nin GI sistem mukozasından geçişinin de saf etkin maddeye göre artacağını ve biyoyararlanım artışı sağlayabileceğini göstermektedir.

4.4.3. İnülin Nanopartikül Formülasyonları

İnülin nanopartiküllerinin hazırlanması ile ilgili literatür oldukça azdır. İnülin ile mikro- veya nanopartiküllerin hazırlanması, inülinin yapısındaki çok sayıda -OH grubu ile etkileşime girecek bir etkin maddenin yüklenmesi veya fonksiyonel bir grup ile inülin konjugasyonunu takiben etkin madde yüklenmesini içermektedir (Fares ve Salem, 2015; Krivorotova ve ark., 2016; Poulain ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2014). İnülin suda kolayca çözünebilen bir polimer olduğundan suda çözünür polimerlerle yapılan çalışmalar referans alınarak nanopartikül hazırlama yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan desolvasyon yönteminde inülin ve etkin madde suda çözülerek ardından organik fazda disperse olması sağlanmış, elde edilen nanopartikül dispersiyonuna çapraz bağlayıcı ilave edilmiş, organik faz uçurulmuş ve çapraz bağlı nanopartiküller santrifüjle ayrılarak elde edilmiştir. Bu sayede inülin matrisinin içerisinde etkin maddenin enkapsülasyonu sağlanmıştır (Çizelge 2.5).

Ön çalışmamızda literatürlerde kullanılan farklı çapraz bağlayıcı ajanlar, çözündüğü faza göre eklenerek etkilerini incelemek amacıyla glutaraldehit, sitrik asit, Tween 20, CDI (N,N-karbodiimizadol), CDI/NHS (N-hidroksisüksinimid), EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid), vanilin kullanılmıştır (Poulain ve ark., 2003; Varshosaz ve Alinagari, 2005; Li ve ark., 2008; Qazvini ve Zinatloo, 2011; Jahanban-Esfahlan ve ark., 2016). FI1 ve FI2 formülasyonlarında çapraz bağlayıcı olarak en çok kullanılan maddelerden birisi olan glutaraldehit yer almıştır. Glutaraldehit miktarı fazla olan FI2 formülünde ürün elde edilememiştir. Glutaraldehitin toksik etkisi sebebiyle diğer çapraz bağlayıcılar denenmiştir. İnülindeki fruktanlar üzerindeki -OH grupları ve taşıdığı -COOH grupları ile reaksiyona girebileceği düşünülen sitrik asit FI3 formülasyonunda çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Vanilin, genellikle kitozan içeren formülasyonlarda kullanılmıştır ve taşıdığı -OH grupları etkileşime açıktır; bu nedenle FI4 formülasyonunda çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Çeşitli literatürlere göre, desolvasyon yönteminde yüzey aktif madde kullanılmış ve organik çözücünde polimerin yapısal bütünlüğünün korunması amaçlanmıştır (Luque-Alcaraz ve ark., 2016; Poulain ve ark., 2003). Bu sebeple FI5 formülasyonunda Tween 20 kullanılmıştır. FI6 formülasyonunda ise vanilin ve Tween 20'nin birlikte etkisi incelenmiştir. FI7 formülasyonunda çapraz bağlayıcı olarak genel esterleşme ajanlarından CDI kullanılmıştır. Hidrofobik iyon çifti yöntemi, suda çözünür iyonik maddelerin enkapsülasyonunu artırmak amacıyla kullanılmakta olup özellikle protein yapısındaki maddelerin enkapsülasyonunda değerlendirilmektedir (Kashi ve ark., 2012). Bu amaçla formülasyonlarda sodyum lauril sülfat (SLS) kullanılmıştır. SAm'e'nin proteine benzer yapısı ve pozitif yükünden dolayı, negatif yüklü SLS ile kompleks oluşturabileceği ve böylece etkin maddenin hidrofobik hale gelerek inülin nanopartikülleri içinde daha yüksek oranda tutulabileceği düşünülmüştür. FI8 formülasyonunda CDI çapraz bağlayıcısına ilaveten hidrofobik iyon çifti oluşturma etkisi incelenmiştir. Suda çözünen SLS'nin, organik çözücünde çözünebilmesi için 300 µl formik asit ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. FI9 formülasyonunda iyon çifti oluşturulması yanısıra Tween 20'nin etkisi incelenmiştir. FI10 formülasyonunda CDI yanında yardımcı çapraz bağlayıcı ajan olarak N-hidroksisüksinimid ilave edilerek etkisi incelenmiştir. FI11 formülasyonunda CDI su fazına eklenmiştir. Qazvini ve ark. (2011) suda çözünür bir polimer olan jelatini kullanarak ürettikleri nanopartiküllerde glutaraldehit ve EDC'yi çapraz bağlayıcılar olarak kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre etkin madde yüklemesi ve salımı modifiye etme açısından EDC çapraz bağlayıcısı daha başarılı bulunmuştur. FI12 formülasyonunda, suda çözünür karbonildimidazol türevi olan

EDC çapraz bağlayıcısı kullanılmıştır. FI13 formülasyonunda ise EDC çağraz bağlayıcısına ilaveten iyon çifti oluşturulması için sodyum lauril sülfat ilave edilmiştir.

Hazırlanan formülasyonların karakterizasyonuna ilişkin bulgular Çizelge 3.19’da verilmiştir. Bu formülasyonlarda etkin madde yükleme etkinliği % 1,209- % 97,26 arasında ve etkin madde içeriği % 0,2418- 19,45 arasındadır. İşlem verimi ise % 4,00 - % 61,31 aralığında değişmektedir. FI1 ve FI13 arasında farklı çapraz bağlayıcılar denenmiş, en yüksek yükleme EDC çapraz bağlayıcısı ile ve hidrofobik iyon çifti oluşturmak için SLS’nin kullanıldığı FI13 formülünde görülmüştür. İşlem verimi ise polimer miktarının artmasıyla arttığı için, FI13 formülünde 25 mg olan polimer miktarı artırılarak FI14 formülasyonunda 250 mg’a yükseltilmiştir. Yüksek yükleme etkinliği ve işlem verimi elde edilmiştir.

Hazırlanan tüm formülasyonlarda partikül büyüklüğü $259,1 \pm 6,5$ - $877,4 \pm 20$ nm,1; PDI $0,744 \pm 0,027$ - $0,342 \pm 0,011$; zeta potansiyeli $-7,97 \pm 0,24$ - $-15,6 \pm 0,8$ mV arasında değişmektedir. En yüksek partikül büyüklüğü glutaraldehitin çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı FI1 formülasyonu ($877,4 \pm 20$ nm) ile hazırlanan nanopartiküller için gözlenirken, en düşük partikül büyüklükleri EDC’nin çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı FI12 ($259,1 \pm 6,5$ nm), FI13 ($261,6 \pm 9,4$ nm) nanopartikülleri için elde edilmiştir. Qazvini ve Zinatloo (2011) da yaptıkları çalışmada jelatin nanopartiküllerinin çapraz bağlanması amacıyla glutaraldehit ve EDC çapraz bağlayıcısı kullanmışlar ve çapraz bağlayıcının partikül boyutu, etkin madde yükleme etkinliği üzerine etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre glutaraldehit kullanıldığında nanopartikül boyutları (280 ± 11 nm), EDC’nin kullanıldığı nanopartiküllere (184 ± 7 nm) göre daha büyük bulunmuştur. Aynı şekilde yükleme etkinliği, EDC ile elde edilen nanopartiküllerde (%27) glutaraldehitle elde edilen nanopartiküllere (%10) göre daha yüksek olmuştur. Bu literatür bulgusu çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Polidispersite indeksi (PDI) FI11 formülasyonu hariç tüm nanopartiküllerde 0,7’nin altında olup partikül büyüklüğü dağılımının dar bir aralıkta olduğunu göstermiştir. PDI açısından en düşük değer FI13 formülasyonu ($0,342 \pm 0,011$) ile hazırlanan nanopartiküller için gözlenmiştir. Elde edilen tüm inülin nanopartikülleri için zeta potansiyel değerleri -7,97 ile -16,2 mV arasındadır. Negatif yük inülin üzerindeki hidroksil gruplardan kaynaklanmaktadır.

Bu sonuçlara göre FI1 ve FI2 formülasyonlarında incelendiğinde, yüksek oranda glutaraldehit kullanıldığında FI2 formülasyonu ile nanopartikül elde edilememiş, FI1’de ise büyük boyutta partiküller ($877,4 \pm 20,1$ nm) elde edilmiştir. Sitrik asit kullanılan FI3 formülasyonu için etkin madde içeriği (% 0,2418) ve işlem verimi (% 4) düşükken oluşan partiküllerin boyutu ($562,8 \pm 30,5$) büyüktür. Çapraz bağlayıcı olarak FI4 formülasyonunda sadece vanilin, FI5 formülasyonunda sadece Tween 20, ve FI6 formülasyonunda ise bu iki çapraz bağlayıcı birlikte kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcılar etkin madde içeriği üzerine sinerjik etki yaparken (sırasıyla % 3,80; 5,483; 6,314) partiküllerin de (sırasıyla, $359,4 \pm 27,5$; $449,1 \pm 40,0$; $608,7 \pm 16,7$) büyümelerine sebep olmuştur (Çizelge 3.19).

Formülasyonda yükleme etkinliğini arttırmak amacıyla hidrofobik iyon eşleşmeşi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem yükü olan etkin maddelerin zıt yüklü bir yağ asidi yada yüzey aktif maddeyle elektrostatik bağ oluşturarak kompleks oluşturması şeklinde tanımlanmaktadır. Bu sayede özellikle peptit-protein, DNA gibi hidrofilik maddelerin biyoyararlanım artmasında oldukça sık kullanılmaktadır. Basit elektrostatik etkileşimden de dolayı maddelerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmemektedir (Farshi, 2013).

FI7 ile FI8 formülasyonları SLS:SAMe kompleksleşmesinin etkisini çok net göstermektedir. SLS eklenen FI8 formülasyonu (% 15,81), FI7 formülasyonuna (% 3,022) göre yükleme fraksiyonunu yaklaşık 5 kat arttırmıştır (Çizelge 3.19). Yapılan bir çalışmada model etkin madde olarak lizozim proteini kullanılmış ve lipozom-hibrit nanopartiküllerine yüklenmiştir. Yükleme etkinliğini arttırmak amacıyla SLS ile kompleks yapılarak nanopartiküllere yüklendiğinde % yükleme etkinliği 11,69’dan 42,85’e çıkmıştır (Bozkır ve Devrim, 2015). Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edildiğinden bundan sonraki formüllerde SLS:SAMe kompleksi kullanılmasına karar verilmiştir.

FI8 ile FI9 formülasyonlarının karakteristikleri incelendiğinde, Tween 20’nin etkin madde içeriğini düşürdüğü (%15,81 ve 8,00) görülmektedir (Çizelge 3.19). Bu durumun, Tween 20’nin hidrofobik olan kompleks yapının çözünürlüğünü artırarak kompleks yapıyı bozmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

FI10 ile FI11 formülasyonlarında CDI'nın su veya organik faza katılması yükleme fraksiyonunu (% 11,21 ile % 10,85) değiştirmedeği ama partikül boyutunu etkilediği ($647,5 \pm 24,6$; $865,0 \pm 24,6$ nm) görülmüştür. FI12 ile FI13'de EDC kullanılmıştır. Etkin madde içerikleri sırasıyla % 10,91 ve % 19,45 olmuştur. Hazırlanan bu formülasyonlar içinde en yüksek etkin madde yükleme fraksiyonu FI13 formülasyonu (%19,45) için elde edilmiştir (Çizelge 3.19). Bu nedenle bu formüldeki inülin oranı artırılarak FI14 formülasyonu hazırlanmıştır. Bu formül, işlem veriminin yüksek olması nedeniyle seçilmiştir. Böylece çapraz bağlayıcıya (EDC) da karar verilmesinden sonra bu formülasyonun optimizasyonuna geçilmiş ve 3^2 düzeyli bir faktöriyel tasarım (Çizelge 2.6) uygulanarak Çizelge 2.7'de bileşimleri verilen FI15 - FI23 formülasyonları hazırlanmıştır. İnülin nanopartiküllerinin karakterizasyon bulguları MLR analizi ile değerlendirilmiştir. Yapılan istatistik çalışmalarında SLS:SAMe oranı ve SAMe miktarı bağımsız değişkenler olarak belirlenirken, bu bağımsız değişkenlere yanıt faktörler olarak partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, PDI, % yükleme etkinliği, % etkin madde içeriği, işlem verimi ve τ_d değerleri incelenmiştir.

SAMe miktarı, PDI üzerine negatif, % yükleme fraksiyonuna pozitif ve işlem verimine negatif; SLS:SAMe oranı partikül büyüklüğüne, zeta potansiyeline, % yükleme etkinliğine, % etkin madde içeriğine ve işlem verimine pozitif katkıda bulunduğu görülmüştür; bu etkiler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$) (Çizelge 3.21, Şekil 3.27).

Bu bulgulara göre formülasyonlardan hazırlanan nanopartiküllerin boyutu 193,9 - 654,3 nm arasındadır ve PDI değerleri 0,7'nin altındadır (Çizelge 3.20, Şekil 3.25). Elde edilen inülin nanopartikülleri için zeta potansiyel değerleri -6,89 ile -16,2 mV arasındadır (Çizelge 3.20).

FI18, FI21 ve FI22 formülleri en yüksek etkin madde içeriğine sahip formüllerdir. Genel olarak inülin nanopartiküler sistemler etkin maddenin salımını geciktirmiştir; 1. saat sonunda saf SAMe'nin %70'i çözünürken, nanopartiküllerden SAMe'nin çıkışı % 22,49 - % 55,45 arasında olmuştur (Şekil 3.26). Bunun nanopartiküllerin çapraz bağlanmasından kaynaklı bir gecikme olduğu düşünülmektedir. Salım pH'ya bağlı olarak değişmektedir ve salımı en çok yavaşlatan formüller FI18, FI19, FI21 ve FI22 olmuştur. En yüksek τ_d değerleri bu formülasyonlar için gözlenmiştir ve sırasıyla 193,8 - 248,4 - 334,0 ve 314,8 dk

olarak hesaplanmıştır. SAME'nin, nanopartiküllerin kolona intakt halde ulaşmasından sonra gecikmeden salınması hedeflendiğinden, Çizelge 3.20'deki bulgular yanısıra uzun olmayan bir $\tau_d = 193,8$ dk değeri veren FI18 formülasyonu, diğer karakteristikler de gözönüne alınarak, sonuç inülin nanopartikül formülasyonu olarak seçilmiştir.

Bunun yanısıra kolon ortamında inülinazın bu süre üzerindeki etkisini görmek için de Bölüm 2.8.5'te anlatıldığı şekilde salım testi yapılmıştır. SGF içine pepsin ve SCoF2 içine inülinaz enzimleri ilave edilmiştir. Yapılan çözünme hızı çalışmaları sonucunda elde edilen salım profilleri Şekil 3.29'da verilmektedir. Enzimli ve enzimsiz ortamlarda elde edilen etkin madde salım profilleri f_2 benzerlik faktörü (Eşitlik 10) ile değerlendirilmiştir: Benzerlik - f_2 faktörü 49,8 olarak hesaplanmıştır. Bulunan f_2 değeri, iki profilin az da olsa farklı olduğunu göstermektedir. Bu fark, özellikle ilk 8 saatte, inülinaz enziminin etkin madde salımını, inülin degradasyonu ile artırma eğiliminden kaynaklanmıştır.

FI18 formülü tekrarlanabilirlik çalışmalarına tabi tutulmuş, tekrar üretilen formüller birleştirilmiş ve birleştirilmiş form tekrar karakterizasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen karakterizasyon sonuçları arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 3.22, Şekil 3.28).

Yapılan permeabilite çalışmaları sonucunda saf etkin maddenin PAMPA permeabilite katsayısı 131×10^{-6} cm/saat iken, inülin nanopartiküllerine yüklenmiş etkin maddelerin PAMPA permeabilite katsayısı 16155×10^{-6} cm/saat olmuştur (Şekil 3.30; Çizelge 3.23). Bu durumun, nedeninin SAME ile kompleks oluşturması için kullanılan SLS'den kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü SLS, anyonik yüzey aktif madde olup, permeasyon arttırıcı olarak birçok dozaj formunda kullanılmaktadır. SLS, PAMPA membranındaki lipidleri çözerek membran permeasyonunu arttırabilmektedir. Bunun yanında katyonik ve suda çözünen SAME ile kompleks oluşturarak SAME'yi hidrofoblaştırarak membran lipidlerindeki çözünürlüğünü arttırmış olduğu düşünülmektedir. Ruponen ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada düşük çözünürlüklü, yüksek permeabiliteye sahip glibenklamidin çözünürlüğünü arttırmak adına kristal, amorf şekilleri yanısıra çeşitli permeasyon arttırıcılarla (serin, arjinin ve SLS) katı dispersiyonlarını hazırlamışlardır. Çözünürlüklerinin yanısıra permeasyon artışı PAMPA sistemleriyle incelenmiştir. En yüksek artışın yüksek oranda SLS içeren arjinin-SLS kombinasyonu ile edildiğini (yaklaşık 25 kat), SLS'nin permeasyon üzerindeki doğrudan etkisini farklı oranlarda SLS kullanılarak bulmuşlardır. Bizim

çalışmamızdaki artışın yüksek olması da daha yüksek konsantrasyonda kullanılan SLS'den kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bakımdan formülasyonda yer alan SLS'nin in vivo koşullarda SAME'nin permeabilite sorununun çözümünde önemli bir etken olacağı düşünülmüştür.

4.5.Optimum Formülasyonların Seçilmesi

Formülasyon çalışmalarının sonucunda SAME yükleme etkinlikleri, etkin madde içerikleri, partikül büyüklükleri ve dağılımları, PAMPA permeabiliteleri açısından en uygun pektin nanopartiküllerinin üretimi için FP9 ve inülin nanopartiküllerinin üretimi için FI18 seçilmiştir. Bu formülasyonlarla, daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere tekrarlı olarak nanopartiküller üretildikten sonra birleştirilmiş ve in vitro karakterizasyon testleri uygulanmıştır. Nanopartiküllerin özellikleri Çizelge 3.24'de verilmiştir. İn vitro salım profilleri ise Şekil 3.31'de görülmektedir. Özellikle FI18 formülasyonu ile hazırlanan nanopartiküllerden etkin madde salımının diğer formülasyonlarla hazırlanan nanopartiküllere göre SGF içinde ilk iki saatte daha düşük olduğu gözlenmiştir.; en yüksek t_a değeri de bu formülasyon için hesaplanmıştır. t_a değerleri sırasıyla FP9 için 56,55 dk ve FI18 için 193,8 dk olmuştur. Bu sonuç, FI18 nanopartiküllerinin in vivo koşullarda SAME'nin gastrik ortamdan korunmasını ve biyoyararlanımının artırılmasını sağlayabileceğini göstermektedir.

4.5.1.Seçilen Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Seçilen formülasyonlarda etkin madde:yardımcı madde etkileşimlerini incelemek için DSC ve XRPD analizi yapılmıştır.

FP9 formülasyonu ile hazırlanan nanopartiküller: Şekil 3.32'de FP9 formülasyonuna ait termogramlar görülmektedir. Nanopartikül formülasyonlarında etkin madde ve yardımcı madde etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla DSC ve XRPD analizi için hazırlanan numunelerin bileşimleri Bölüm 2.9.1, Çizelge 2.8'de verilmiştir. SAME'ye ait termogramda

158,4°C’de görülen küçük endotermik pikin SAME’nin erimesine ait olduğu ve sonrasında dekompozisyona uğradığı anlaşılmaktadır. Pektine ait termogramda 100°C’ye kadar olan geniş endotermik pikin, fiziksel olarak adsorbe olan su molekülünün ya da pektindeki hidroksil gruplarıyla hidrojen bağı yapabilen su moleküllerinin desorpsiyonuna ait olabileceği düşünülmektedir. Daha sonraki sıcaklıklarda görülen ekzotermik pikler bazı bağların ya da fonksiyonel grupların yıkımı, yapısal depolimerizasyon veya polisakkarit zincirlerindeki yıkıma ait olabilir. Bu tip ekzotermik pikler kompleks veya bir dizi kimyasal reaksiyonların gerçekleştiğini göstermektedir. Bu tip termal dekompozisyon reaksiyonları, genel olarak uçucu organik bileşenlerin oksitlenerek CO₂, CO ve H₂O’ya dönüşmesi sonucu oluşan oksidatif reaksiyonlardır. Elde edilen termogram literatür verileriyle benzerlik göstermektedir (da Costa ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2015).

BaCl₂’e ait termogramda 107,5°C ve 160,8°C’de 2 adet pik görülmektedir. Bunun ilkinin suyun desorpsiyonuyla ilgili olduğu, ikinci pikin de maddenin kristal yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuçlar, literatürdeki BaCl₂.2H₂O termogramıyla uyumlu çıkmaktadır (Wynne, 1975). Formüle ait fiziksel karışımın termogramında, SAME ve BaCl₂ piklerinin kaydığı görülmüştür. Ancak nanopartikülerin termogramında yapıya katılan maddelere ait kristal yapının tamamen kaybolarak polimer içinde amorf halde bulunduğu görülmüştür. Bu sebeple etkin maddenin yüksek oranda polimer içinde hapsediği düşünülmektedir.

Pektine ait X ışını difraktogramı incelendiğinde polimerin tamamen amorf olduğu görülmektedir (Şekil 3.34). SAME de amorf yapıda görünmektedir; DSC termogramındaki küçük erime piki ile birlikte değerlendirilirse, etkin maddenin yarıkristalen durumda olduğu düşünülmektedir. Çapraz bağlayıcı olan BaCl₂ ve NaHCO₃ kristal yapılı olup belirli açılarda keskin karakteristik pikleri mevcuttur. Bu veriler literatür verileriyle benzerlik göstermektedir (Chandra ve ark., 2013; Leonesa ve ark., 2014; Özkazanç ve ark., 2010). Pektin nanopartikülüne ait fiziksel karışımın difraktogramında BaCl₂ ve NaHCO₃’a ait karakteristik kırınım pikleri görülmektedir, fakat BaCl₂’e ait bazı piklerin şiddetinde düşüş dikkat çekmektedir (Şekil 3.34). Bu düşüşün diğer yardımcı maddelerle etkileşmeden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. FP9 formülünün difraktogramı incelendiğinde hiçbir karakteristik pik görülmemektedir. Bu durum, DSC bulguları ile uyumlu olup etkin madde

ve yardımcı maddelerin nanopartiküller içinde amorf formda bulunduklarını göstermektedir.

FI18 formülasyonu ile hazırlanan nanopartiküller: Şekil 3.33’da verilen termogramlar incelendiğinde, inülin termogramındaki geniş pik, suyun desorpsiyonuna bağlı gelişen endotermik bir piktir; 221°C’de camsı geçiş sıcaklığına ait bir düşüş görülmektedir ve ilerleyen sıcaklıklarda yanma gerçekleşmiştir. SLS’nin DSC termogramı 100°C civarında küçük endotermik pikler göstermiştir. Bunlar SLS’nin dehidrasyonunu göstermektedir; 194.36°C’de SLS’nin erimesi nedeniyle endotermik bir pik gözlemlenmiştir. SLS’nin degradasyonu nedeniyle SLS’nin erime pikinin ilerisinde küçük pikler gözlemlenmiştir. İnülin nanopartiküllerine ait termogram incelendiğinde SAME ve SLS etkileşmesiyle formülasyonda ikisinin de piklerinin azaldığı fakat yine de SAME’nin karakteristik pikinin olduğu görülebilmektedir.

İnüline ait X ışını difraktogramı incelendiğinde, belirli noktalarda keskin pikler görülmektedir (Şekil 3.35). Bunların en karakteristik olanları $\theta \sim 12^\circ$ ve $\sim 21^\circ$ ’deki kırınım pikleridir. Formülasyona ait fiziksel karışımın difraktogramında da inülinin karakteristik pikleri görülmektedir. FI18 nanopartikül difraktogramında ise SLS’ye ait $\theta = 2^\circ$ ’deki karakteristik pik dışında diğer tüm kırınım pikleri kaybolmuştur. Bu durumun nanopartiküler sistem içerisinde SAME’nin kompleks oluşturmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Formülde inülinin karakteristik tüm pikleri görülmesine rağmen şiddetlerindeki azalmanın ise yapısında meydana gelen çapraz bağlanmadan kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.5.2.Nanopartiküllerin Görüntülenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Pektin nanopartikülleri SEM ve TEM analizinde küresel partiküler sistemler olarak görüntülenmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde küresel ve 100-400 nm civarında nanopartiküller görülmektedir (Şekil 3.36 ve Şekil 3.37). Şekil 3.38’da FI18 formülasyonu ile üretilen inülin nanopartiküllerinin SEM görüntüleri verilmiştir. İnülin nanopartiküllerinin 1 μm ’den küçük küresel şekle yakın agregatlar şeklinde elde edilmiştir.

4.6.Etkin Madde Salımının Modifiye Edilmesi için Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tezde temel amaç etkin maddenin kolona hedeflendirilerek biyoyararlanımının artırılmasıdır. Kolona hedeflemede Bölüm 1.2’de açıklandığı üzere genel olarak üç strateji vardır: pH’ya duyarlı sistemler, mikroflora aktivasyonuna dayanan sistemler ve zaman kontrollü sistemler.

Bu sistemler genel olarak bazı dezavantajlar içerirler, ancak kombine bir şekilde kullanımları avantaj sağlamaktadır. Çalışmamızda mikroflora aktivasyonuna dayanan polimer kullanılarak etkin madde salımı hedeflenmiştir. Fakat GI sistem boyunca suda çözünen etkin maddenin midede erken salınması riski nedeniyle, pH duyarlı sistemlerle birlikte kullanılmıştır. Bu sebeple nanopartiküller enterik polimerlerle kaplanmış ve böylece pH’ya duyarlı sistemler ile mikroflora aktivasyonuna dayanan sistemlerin kombine kullanımı hedeflenmiştir.

4.6.1.Akışkan Yatak Cihazında Kaplama Çalışmalarının Ön Denemelerine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Akışkan yatak, endüstride kurutma, granülasyon ve kaplama gibi bir çok temel işlemde kullanılan cihazdır. Konvansiyonel katı formdaki ilaçlarda oldukça sık kullanılmasının yanında nanopartiküllerin katı dozaj forma getirilmesi amacıyla, bir taşıyıcı içinde spreyle kurutarak mikro-içinde-nanopartiküller, üzerine bağlayıcı ilave edilerek nanopartiküllerden oluşan granüller elde edilmektedir. Bu sayede nanopartiküllerin tablet, kapsül gibi konvansiyonel dozaj formlarına dönüşebilmesine olanak sağlanmaktadır. Tez kapsamında bu motivasyonla Mini-Glatt akışkan yatak sistemi mikro kiti ile kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür.

Çalışmamızda elde ettiğimiz nanopartiküller sulu alt kaplama çözeltisi içerisinde disperse edildikten sonra inert pelletler üzerine kaplanmış ve daha sonra kolonda etkin madde salımının sağlanması adına nanopartikül kaplı pelletlere ikinci bir işlem olarak Eudragit FS 30D sulu dispersiyonu ile kaplama yapılmıştır. Kaplama işleminin başarısı için,

inert pellet miktarı, cihaza giren hava miktarı/sıcaklığı, ürün sıcaklığı, atomize edici hava basıncı ve bağlayıcı püskürtme hızı değiştirilerek farklı püskürtme rejimlerinde, akışkan yatak Wurster kolonu / alttan püskürtme yapan inserti ile ön çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 2.9) (Dixit ve Puthli, 2009; Pusapati ve Rao, 2014). Akışkan yatak cihazında etkin bir kaplama yapmak için ilk koşul partiküllerin giren hava yardımıyla bireysel olarak akışkanlaştırılması olmuştur. Partiküllerin akışkanlaşmaya başladığı ilk hıza minimum akışkanlaştırma hızı denmektedir. Partiküller akışkanlaşmaya başladıktan sonra uygulama (kaplama, granülasyon) gerçekleştirilebilmektedir. Çalışmamızda toz partiküller kontrol panelinden takip edilerek tozların akışkanlaşmaya başladığı uygun yükseklik belirlenmiş ve buna göre giren hava miktarı 13,6 m³/saat olarak sabit tutulmuştur (Çizelge 2.9). Akışkan yatak cihazına ait 0,5 ve 0,3 mm çapa sahip iki tane püskürtme başlığı bulunmaktadır. Kaplama çözeltisinin viskozluğunun düşük olmasından dolayı ve küçük damlacık boyutu elde etmek için 0,3 mm çapa sahip başlık kullanılmıştır. Çalışmada minimum miktarda pelletle çalışılmıştır. Bu sebeple 5 g pellet olarak başlanılan çalışmalara 4 g pellet kullanımı ile devam edilmiştir. Yüzey alanı yüksek olacağı için elimizdeki en düşük partikül çapına sahip mikrokristal selüloz pelletle (106-212 µm) çalışılmıştır. Kaplamada önemli parametrelerden birisi de ürün sıcaklığıdır. Kaplama gerçekleştikten sonra sulu ya da organik çözücü içerisindeki kaplama materyali ürüne temas edip sıcaklık yardımıyla çözücünün buharlaşması gerçekleşmektedir. Bundan dolayı kaplamanın oluşması için sıcaklık optimum olmalıdır. Yapılan çalışmada ürün sıcaklığı 35°C, giriş hava sıcaklığı 45°C, ürün sıcaklığı 40°C ve giriş hava sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. HPMC alt kaplama için ürün sıcaklığının 40°C ve giriş hava sıcaklığının 50°C olması uygun bulunmuştur.

Bunun yanı sıra cihazda bir dakikada püskürtülecek sıvı hacmini bulmak amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu kapsamda ortalama çözelti hacmi belirlenmiş, sisteme sıvı girişini sağlayan peristaltik pompanın dönü hızı bu hacme göre ayarlanmıştır. Yüksek ve düşük dönü hızları kullanıldığında 10 rpm'in uygun püskürtme hızı olduğu bulunmuş ve daha sonraki çalışmalarda bu değer sabit tutulmuştur. Atomizasyon basıncı yüksek gerilim kuvveti sayesinde damlacık çaplarını 10-40 µm'e kadar düşürmektedir. Bu da kaplamanın etkinliğini arttırmaktadır. Atomize hava basıncı 0,5 bar olduğunda, daha homojen bir kaplama yapılmıştır. Şekil 3.39'de Çizelge 2.9'da koşulları verilen işlemlerle elde edilen pelletler görülmektedir ve işlem numaraları fotoğraflar üzerinde belirtilmiştir. Buna göre P10 ve P11 pelletleri homojen olarak kaplanmış görünmektedir. Bu durum, artan basınç ile çapı azalan

kaplama çözelti damlacıklarının, pelletin yüzeyini daha homojen olarak kaplamasından kaynaklanmaktadır.

Bu aşamadan sonra nanopartikül kaplı pelletler üzerine fonksiyonel kaplama uygulanması aşamasına geçilmiştir (P13 – P19). Ön çalışmalarda Eudragit FS 30D sulu dispersiyonu kullanılmıştır. Fakat i) püskürtme kanallarının sürekli tıkanması, ii) pK_a 'sı 7.0 olduğu için hedefimiz olan proksimal kolonda (pH 5.7) etkin maddeyi salmaya uygun olmaması nedeniyle bu polimerden vazgeçilmiştir. Eudragit L 30D-55 ($pK_a \sim 5,5$) sulu dispersiyonuyla, daha önceki elde edilen parametrelerde bazı değişiklikler yapılarak kaplama gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.10).

Daha önceki çalışmalarda Wurster kolonu ile alttan püskürtme uygulanmıştır. Ancak bu aşamada, toz miktarının azlığı (4 g), yaklaşık 100 μm küçüklüğünde tozları kaplayabilmesi ve işlem kolaylığı nedeniyle üstten püskürtmeyle kaplama işlemine devam edilmiştir. Kaplanılacak süspansiyon/çözelti inert pelletler üzerine püskürtülerek akışkan haldeki pelletler üzerine film oluşması sağlanıp, kaplama gerçekleştirilmiştir. Üstten püskürtmeyle kaplamada alttan püskürtmeyle kaplamaya (Wurster) göre kaplama ürün tekdüzeliği biraz düşüktür. Bunun sebebi kaplama sıvısının hızlı (premature) buharlaşarak pelletleri birbirine bağlamasıdır. Bu durumu engellemek için 10 rpm dönü hızını 5 rpm dönü hızına düşürülmüştür ve giren hava sıcaklığı 35-40°C yapılarak ürün sıcaklığı, 34-34°C'de sabit tutulmuştur. Böylece dönü hızı, sıcaklık ayarlanarak ve çözelti/süspansiyon porsiyonlar halinde eklenerek kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Giren hava miktarı tozların akışkanlığı ana püskürtme başlığının da altında kalacak şekilde 13,6 m^3/s' den 10 $m^3/s'e$ ayarlanmıştır. Pelletlerin agregasyonu gözleme panelinden gözlenmiş ve gerektiğinde vibrasyon uygulanarak partiküllerin olağan modelde bireysel şekilde hareketiyle tekdüze kaplanması sağlanmıştır (Dewettinck ve Huyghebaert, 1998). Kaplamanın kalınlığını belirlemek amacıyla öncelikle saf etkin maddenin pelletler üzerine kaplaması gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlara göre etkin maddenin HPMC içinde çözülerek uygulandığı sadece alt kaplama yapılmış pelletler ile gerçekleştirilen çözünme hızı çalışmasında etkin maddenin ilk 4 saatte yaklaşık olarak % 89'u salınmıştır (Şekil 3.40– Kaplama 0). Bu alt kaplama üzerine yapılan fonksiyonel kaplamalarla gerçekleştirilen çözünme hızı çalışmalarında ise kaplama

oranı arttıkça çıkışın azaldığı görülmektedir. Yaklaşık olarak 24 saat sonunda %7 kaplama için SAME salımı %90, %14 kaplama için salım %83 ve %21 kaplama için salım % 43 olmuştur (Şekil 3.40). Farmakope limitine göre, geciktirilmiş salım için, ilk 2 saatte salınan etkin madde %10'dan fazla olmamalıdır (USP 40, 2019). Bu sonuçlara göre pelletlerde optimum fonksiyonel kaplama oranı olarak %14 a/a oranı ile devam edilmesine karar verilmiştir.

4.6.2.Kaplanmış Pelletlerde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Kaplanmış pelletler: Alt kaplama ile nanopartiküllerin kaplanmış olduğu pelletlere ait partikül büyüklüğü sonuçları incelendiğinde (Çizelge 3.26; K₁FI18 ve K₁FP9) inert pellet yüzeylerinin inülin nanopartikülleriyle oldukça homojen bir şekilde kaplandığı, partikül büyüklüğündeki düşük seviyedeki artış (197 µm'den 199 µm'ye) ile anlaşılmaktadır. Ancak pektin nanopartikülleri ile kaplanmış pelletlerde partikül boyutu 197µm'den 287 µm'e çıkmıştır. Span değeri boyut dağılımındaki homojeniteyi göstermektedir. Bu değer ne kadar küçük olursa boyut homojenliği o kadar yüksektir. İnülin nanopartikülleri ile kaplı pelletlerin span değeri 0,631 olup pektin nanopartikülleri ile kaplı pelletlerin span değerinden (3,024) daha düşüktür; bu bulgu da inülin nanopartikülleri ile daha homojen bir kaplama elde edildiğini göstermektedir. Tüm pellet formülasyonlarında partikül büyüklük dağılımı monomodal olmuştur (Şekil 3.41, Şekil 3.42).

Eudragit L30D-55 ile fonksiyonel kaplama uygulanan pelletlerde partikül büyüklüğünde artış görülmüştür (Çizelge 3.26). Partikül büyüklüğü, inülin nanopartikülleriyle kaplı pelletlerde (K₂FI18) 199 µm'den 201 µm'ye çıkarken pektin nanopartikülleriyle kaplı pelletlerde (K₂FP9) 287 µm'den 346 µm'ye yükselmiştir. Pektin nanopartikülleriyle hazırlanan K₂FP9 pelletlerinde partikül büyüklüğündeki artışın daha fazla oluşu, jel yapısındaki pektinin pelletler arasındaki agregasyonu arttırmasıyla açıklanmıştır. Bununla uyumlu olarak, Dv90 değerleri incelendiğinde K₂FP9 pelletlerinin K₂FI18 pelletlerinden daha büyük agregatlara sahip olduğu görülmektedir.

İnert pelletlerin zeta potansiyeli -2,46 mV olup inülin ve pektin nanopartikülleriyle kaplanınca bu değerin polimerlerin yüklerine bağlı olarak sırasıyla -11,30 ve -18,1 mV yükseldiği görülmektedir ($p < 0,001$) (Çizelge 3.27). Fonksiyonel kaplama ise sadece inülin ile hazırlanan K₂FI18 pelletlerinde yüzey yükünde (-19,6 mV) anlamlı değişikliğe sebep olmuştur ($p < 0,0001$). Her bir kaplamada pellet üzerindeki zeta potansiyel artışı kaplama işleminin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

Kaplanmış pelletlerde, nanopartiküler sistemlerin karakteristik özelliklerinde değişiklik olup olmadığını belirlemek amacıyla rekonstitüsyon çalışmaları yürütülmüştür. Pelletlerin üzerindeki enterik polimer kaplaması çözüldükten sonra ortama salınan nanopartiküllerin yapılarını korumaları hedeflenmiştir. Bunu belirlemek amacıyla alt kaplı pelletler üzerindeki partiküllerin boyutu ölçülerek değişiklik olup olmadığı incelenmiştir. Nanopartiküller alt kaplama aşamasındaki çözelti içerisinde bulunduğundan sadece alt kaplanmış formüller üzerinde rekonstitüsyon yapılmıştır. Her iki formül için partikül boyutunda ve partikül boyut dağılımında değişiklik olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.28, Şekil 3.43, Çizelge 3.29, Şekil 3.44).

Inülin nanopartikülleri kaplanmış pelletlerde (K₂FI18) etkin madde içeriği % 1,26'dır ve başlangıçta nanopartiküller içinde bulunan etkin maddenin % 118'ine karşılık gelmektedir ve etkin madde kaybı bulunmamaktadır. Pektin nanopartikül kaplanmış pelletlerde (K₂FP9) etkin madde içeriği % 0,32'dir ve başlangıçta nanopartiküller içinde bulunan etkin maddenin % 70'ine karşılık gelmektedir (Çizelge 3.30) Bu durum pektin nanopartikülleri içinde etkin maddenin stabilitesinin düşük olması ile ilişkili olabilir.

Kaplanmış pelletlerden etkin maddenin salımı beklenildiği gibi nanopartiküllere göre salımı geciktirmiştir (Şekil 3.45). İnülin nanopartiküler sistemlerden 2. saatin sonunda % 31 salım olurken, kaplanmış pelletlerden etkin maddenin %10'u salınmıştır. τ_d değerleri karşılaştırılacak olursa inülin nanopartiküllerinin τ_d değeri (2,33 saat), kaplandıktan sonra önemli ölçüde (8,3 saat) artmıştır. Benzer bir artış (0,98'den 17,42 saate) pektin nanopartiküllerinde de görülmüştür. Çalışmamızda etkin maddenin hedef salım bölgesinin kolon olduğu göz önünde bulundurulursa kaplı pelletler ile elde edilen bu gecikmiş SAME salımının avantaj getireceği düşünülmektedir.

4.6.3.Pelletlerin Görüntülenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

K₂FI18 ve K₂FP9 formüllerinin SEM görüntüleri incelendiğinde küresel pellet yapısı ve üzerine kaplanmış nanopartiküller görülmektedir. Bu sayede tek tabaka halinde kaplamanın başarıyla gerçekleştiği görüntülenmiştir (Şekil 3.46, Şekil 3.47).

4.6.4.Kaplanmış Pelletlerde Etkin Madde ve Yardımcı Madde Etkileşimlerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

K₂FI18 formülasyonunda yer alan maddelerin termogramları incelendiğinde, alt kaplamada yer alan amorf karakterli Pharmacoat 606 (HPMC) polimerinin 71,78°C’de camsı geçiş sıcaklığını gösteren bir omuz; formülde yer alan diğer madde PEG 6000 maddesinin ise 64,58°C’de erime noktasına karşılık gelen keskin bir endotermik pik verdiği görülmektedir (Şekil 3.48). Fonksiyonel kaplama dispersiyonunun yaklaşık 60°C’de camsı geçiş sıcaklığı ve 241°C’de erime noktasına karşılık gelen geniş bir endotermik pik verdiği görülmektedir. Fiziksel karışımda ve K₂FI18 formülasyonunda tüm bu karakteristik piklerin kaybolduğu görülmektedir. Bu sonuç, kaplı pelletler içinde etkin madde ve yardımcı maddelerin amorf yapıda bulunduklarını göstermektedir.

K₂FP9 formülünde fark inülin yerine pektin bulunmasıdır. Diğer bileşenler aynıdır. Bu pelletler içinde de etkin madde ve yardımcı maddelerin amorf halde bulunduklarını göstermektedir (Şekil 3.49).

XRPD difraktogramları incelendiğinde K₂FI18 ve K₂FP9 formüllerine ait difraktogramlar, inert pelletlerin difraktogramı ile aynıdır; bu durum, kaplanmış pelletlerde bileşenlerin amorf şekilde bulunduğunu göstermektedir (Şekil 3.50 ve Şekil 3.51). Kaplama formüllerindeki amorf karakterin nedeninin Eudragit L30-55’den kaynaklanabileceği gibi alt kaplamadaki PEG 6000 ve fonksiyonel kaplamadaki trietil sitratın plastizer özelliğinden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Chomcharn ve Xanthos, 2013).

4.6.5. Nanopartiküller, Kaplanmış Pelletlerde Stabilite Çalışmalarının Bulgularının Değerlendirilmesi

Birçok çalışmada pektin stabilite arttırıcı ajan olarak formülasyonlara girmektedir (Qiu ve ark., 2018; Yu ve ark., 2014). Bu açıdan nanopartiküllerin hazırlanmasında pektin kullanımının SAME'nin stabilitesini arttıracakı öngörülmüştür. Ancak, pektin nanopartiküllerinin (FP9) 6 aylık stabilite verileri, bu nanopartiküller içinde etkin maddenin miktarının önemli derecede azaldığını ve formülasyonun stabil olmadığını göstermektedir. Nanopartiküller içindeki SAME miktarı, $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de % 5,392'den % 0,32'ye ve 25°C 'de % 0,0492'e düşmüştür (Çizelge 3.31). Bu azalmanın, polimer ve etkin madde etkileşmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan DSC ve XPRD çalışmalarıyla bu etkileşimler görülmektedir. Bunların yanında hidrofilik yapıdaki pektin molekülünün ve higroskopik etkili çapraz bağlayıcı BaCl_2 'ün ortamdaki nemi absorplayarak hidroliz ve oksidasyona dayanıksız olan SAME'yi kimyasal olarak instabil hale getirmiş olabileceği düşünülmektedir. Partikül büyüklüğü açısından incelendiğinde pektin nanopartikülleri $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 6 ay boyunca stabilitesini korurken, 25°C 'de ise 3. aydan itibaren anlamlı bir boyut artışı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Bunun nedeninin higroskopik etkili çapraz bağlayıcı BaCl_2 'ün muhtemelen ortamdaki nemi absorplamasından ve pektinin şişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Stabilite testinde, zeta potansiyel değerlerinin $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de ve 25°C 'de sabit kaldığı ($p>0,05$), fakat 6.ayda arttığı görülmüştür. Bunun nedeninin azalan katyonik etkin madde nedeniyle toplam yüzey yükü değerinin düşmesi olduğu düşünülmektedir.

Pektin nanopartiküllerinin stabilite açısından dezavantajlı durumunu çözmek için tekrar üretilen pektin nanopartikülleri havadan gelebilecek nemi ortadan kaldırmak ve olası oksidasyon riskini önlemek için havası alınmış kaplarda tekrar stabilite çalışmalarına alınmıştır. Bu stabilite testinin sonuçlarına göre pektin nanopartiküllerinin içindeki SAME, ilk ay $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de %100'den 86'ya inerken, 25°C 'de % 45'e düşmüştür; 3.ay verilerinde ise $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de % 37 ve 25°C 'de % 34'e kadar etkin madde miktarı düşmüştür. Bu sonuç pektin nanopartiküllerindeki stabilite sorununun havadaki nemden ziyade formülasyona katılan yardımcı maddelerden kaynaklandığını göstermiştir.

Pektin nanopartikülleri kaplanmış K₂FP9 formülü stabilite sonuçlarına bakıldığında, kaplamanın FP9 formülünün stabilitesini kaplama işleminden sonra önemli ölçüde arttırdığı görülmektedir (Çizelge 3.34). FP9 formülünde 6. ayın sonunda etkin maddenin 5±3°C’de %14’ü, 25 °C’de % 0,9 ‘u kalmıştır. Kaplanmış formüllerde ise 6. ayın sonunda 5±3°C’de %71,86’sı, 25±2°C’de % 34,38’i kalmıştır. Tüm kaplı formüllerde S,S/ R,S oranı incelendiğinde zaman içerisinde bu oranın azaldığı gözlenmiştir.

Buzdolabı koşullarında (5±3°C) saklanan inülin nanopartiküllerinin (FI18) 6 aylık stabilite sonuçlarına göre etkin madde miktarı, partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel açısından stabilitesinin korunduğu görülmektedir (Çizelge 3.32). Bu durumun SAME’nin SLS ile oluşturduğu kompleks yapı nedeniyle bozunmalara karşı moleküler düzeyde korunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnülin nanopartikülleri kaplanmış K₂FI18 pelletlerin stabilite sonuçlarına göre 5±3°C’deki formüller 6 ay boyunca stabilitesini korurken, 25±2°C’de 6.ayın sonunda % 59,5’e düşmüştür. FI18 formülündeki stabilite koşullarında 6 ayın sonunda, 25±2 °C’deki stabilite bulgularına göre etkin madde içeriği %80’e düşerken kaplanmış formundaki bu fazla miktardaki düşüşün SAME’nin kaplı pellet formülasyonlarında yardımcı maddelerle yüksek oranda etkileşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Çizelge 3.35).

Ayrıca SAME’nin saf etkin madde olarak stabilitesine kaplamanın etkisini incelemek amacıyla sadece SAME ile kaplanmış pelletlerin stabilite sonuçları Çizelge 3.33’te verilmiştir. SAME’nin stabilitesi 6 ay boyunca yapılan stabilite sonuçlarına göre ilk 3 ay iki koşulda da korunmuş, 6.ayda 5±3°C’de %50’sine düşerken, 25±2°C’de %23’e düşmüştür.

İncelenen tüm bu formülasyonlar arasında SAME’nin stabilitesi açısından en uygun formül, inülin nanopartikül formülasyonları olmuştur

4.7.SAMe Yüklü Formülasyonların İn Vivo Etkinliğine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Formüller Bölüm 2.11’de belirtildiği şekilde sıçanlara uygulanmış, zamana karşılık plazma SAMe konsantrasyonları belirlenmiştir. SAMe endojen bir madde olduğu için $t=0$ ’da ölçülen plazma SAMe konsantrasyonu, daha sonraki zamanlarda ölçülen plazma SAMe konsantrasyonlarından çıkarılarak elde edilen sonuçlarla farmakokinetik parametreler hesaplanmıştır. Zamana karşı plazma SAMe konsantrasyon profilleri Şekil 3.52’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre pektin (0,121 $\mu\text{g/mL}$) ve inülin (0,124 $\mu\text{g/mL}$) formülleri maksimum plazma konsantrasyonunu saf SAMe çözeltisine göre (0,0907 $\mu\text{g/mL}$) arttırmıştır. Kaplanmış pektin (0,185 $\mu\text{g/mL}$) ve kaplanmış inülin (0,220 $\mu\text{g/mL}$) pelletler ise nanopartikül formlarına göre maksimum plazma konsantrasyonunu daha fazla arttırmıştır. Bu artışın kolondaki enzim seviyesinin düşük olmasından dolayı SAMe’nin metabolizasyonunu geciktirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunlardan sadece kaplı inülin pelletleri maksimum plazma düzeyini istatistiksel anlamlı şekilde arttırmıştır.

Maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşılan $T_{\max}$ (Ortalama $\pm$ SH) değerlerine bakıldığında, en yüksek $T_{\max}$ değerinin fonksiyonel kaplı pelletlerde olduğu görülmektedir (K₂FI18 formülü için $7\pm 1,88$ saat; K₂FP9 formülü için $8,33\pm 1,00$ saat). Ancak bu değerler SAMe çözeltisi ve nanopartiküllerin $T_{\max}$ değerlerinden (FI18 nanopartikülleri için $4,46\pm 3,91$ saat; FP9 nanopartikülleri için $2,88\pm 1,85$ saat ve SAMe çözeltisi için $4,50\pm 3,90$ saat)) istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı değildir.

Elde edilen bulgulara göre SAMe’nin biyoyararlanımı tüm formüllerde çözeltisine (0,521 $\mu\text{g/mL/saat}$) göre artış göstermektedir. Fakat bu artış sadece inülin nanopartikülleri kaplanmış K₂FI18 pellet formülasyonu (1,992 $\mu\text{g/mL/saat}$) için SAMe çözeltisinden (0,521 $\mu\text{g/mL/saat}$) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,01$). SAMe’nin çözeltisine göre bağıl biyoyararlanımı inulin ve pektin nanopartikülleri ile % 128 ve % 184 ; inulin ve pektin nanopartikülleri ile kaplı pelletler ile % 383 ve % 260 artmıştır. İnülin kaplı pellet formülasyonunun, inülin nanopartiküllerine göre biyoyararlanımı anlamlı derecede artırması, pellet formülünün etkin maddeyi kolona başarı ile hedeflendirdiğini göstermektedir. Kolonda inülinin bakterilerle parçalanması ile açığa çıkan etkin maddenin

buradan absorbe edilebildiği anlaşılmaktadır. Bu absorpsiyonda, PAMPA modeli ile de gösterildiği gibi formülasyondaki SLS'nin permeabilite artırıcı etkisinin katkısı olmuştur. Çünkü permeabilite artırıcı maddeler, düşük enzim aktivitesi, düşük sıvı miktarından kaynaklı yüksek konsantrasyonlara kolay ulaşabilme gibi etkilerinden dolayı ince bağırsağa göre kolonda daha etkilidirler.

Buna benzer bir çalışma düşük permeabilite özelliği gösteren atenolol üzerinde yapılmıştır. Atenolol ile zıt yüklü brilliant mavisi ve bromofenol mavisi iyon kompleksi oluşturulmuştur. Kolonik doku kullanılarak Doluisio metoduna dayalı kapalı membran perfüzyon (close loop perfusion) metoduyla permeabilite tayini yapılmış ve membran bütünlüğünde herhangi bir bozulma gerçekleşmemiştir. Brilliant mavisiiyle permeabilite değeri 0.232 ± 0.021 cm/s den 0.508 ± 0.038 cm/s'ye çıkarken, bromofenol mavisi ile 0.405 ± 0.044 cm/s'ye çıkmıştır ve membran bütünlüğü bozulmadığından dolayı tüm artışın iyon kompleksi sayesinde gerçekleştiği görülmüştür. Daha sonra bu kompleksin poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) nanopartiküllerine enkapsüle edilerek oral biyoyararlanım çalışması yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre iyon kompleksi içeren nanopartiküller, saf etkin madde çözeltisine göre biyoyararlanımı 2,4 kat arttırmıştır (Lozoya-Agullo ve ark., 2016, 2019).

Samiei ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada yüksek elektrik yükünden dolayı yüksek hidrofilliğe sahip alendronat etkin maddesinin iyon kompleksi ile çözünürlüğünün düşürülerek permeabilitesi ve biyoyararlanımı arttırılması amaçlanmıştır. Zıt yük olarak arjinin, fenazopiridin, hyosin ve piridostigmin kullanılmıştır. Elde edilen kompleksler n-oktanol-su sistemindeki partisyon katsayısı ile bağlanma oranları ile karakterize edilerek PAMPA ve Caco-2 hücre hattında permeabiliteleri ölçülmüştür. Arjinin ve fenazopiridin kompleksleri alendronatın permeabilitesini PAMPA sisteminde 14-26 kat, Caco-2 hücre hattında 6,5-4,4 kat arttırmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

SAMe'nin düşük biyoyararlanımı arttırmak amacıyla gerçekleştirilen tez çalışmasında;

- Kitozan nanopartikülleri karakterizasyon bulgularına göre etkin madde nanopartiküllere çok düşük oranda yüklenebilmiştir ve bu sebeple kitozan nanopartikülleri ileri karakterizasyon işlemlerinden ve in vivo çalışmalardan çıkarılmıştır. Kitozan nanopartiküllerinin yükleme etkinliğini artırmak amacıyla başka polimerler yardımıyla kompleksleştirme veya emülsiyon-çözücü buharlaştırma gibi çeşitli yöntemler kullanılarak formülasyon çalışmaları yapılabilir.
- Pektin nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemiyle üretilmiştir. Ancak pektin nanopartiküllerinin SAMe'nin stabilitesini koruyamadığı gözlenmiştir. Bunun ortamdaki nemden ve oksijenden kaynaklandığı düşünülmüş ve vakumlu cam flakonlar içine koyulan formülasyonlar tekrar stabilite çalışmalarına alınmış ve 3.ay stabilite testleri yapılmıştır. İkinci stabilite çalışmaları sonuçlarına göre bozunma bir miktar yavaşlasa da devam etmiştir. Bu sebeple SAMe ile yapılacak formülasyon çalışmalarında uygun ambalaj materyali seçilmeli, koruyucu eklenmeli ve yardımcı madde seçiminde olası geçimsizlikler (alkali, higroskopik maddeler vb. maddeler ile geçimsizlik) gözönünde bulundurulmalıdır.
- İn vivo çalışmalara bakıldığında biyoyararlanımda artış görülmüştür; fakat istatistiksel olarak bu artışın önemli olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür. Pektin nanopartikül formülasyonlarına eklenecek permeabilite artırıcılar ile SAMe'nin biyoyararlanımını anlamlı şekilde arttırabileceği düşünülmektedir.
- İnülin nanopartikülleri desolvasyon yöntemiyle üretilmiştir. SAMe'nin, SLS ile hidrofobik bir kompleksinin oluşturulması inülin nanopartiküller içine etkin madde yükleme etkinliğini önemli ölçüde artırmıştır. İnülin nanopartiküllerinin SAMe'nin stabilitesini daha iyi derecede koruyabildiği tespit edilmiştir. PAMPA modelinde SAMe'nin permeabilitesinin inülin nanopartikülleri ile önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. İn vivo çalışmalarda inülin nanopartiküllerinin SAMe biyoyararlanımını artırdığı, ancak istatistiksel olarak bu artışın önemli olmadığı ($P>0,05$) görülmüştür.

- Pektin (FP9) ve inülin (FI18) nanopartiküllerinin kolona hedeflendirilmeleri için inert pelletler üzerine kaplanmalarından sonra enterik polimer Eudragit L 100 ile fonksiyonel kaplamaları yapılmıştır.
- Elde edilen kaplama formülleri ile in vivo çalışmalar yürütülmüştür. Bu sonuçlara göre tüm kaplama formülleri biyoyararlanımı arttırmasına rağmen sadece FI18 kaplanmış formül anlamlı derecede arttırmıştır ($p<0,05$). Bunun ise formüldeki permeabilite arttırıcı olan SLS'den kaynaklandığı düşünülmektedir.
- Bu sebeple kolona hedefli sistemlerde permeabilite arttırıcılar yardımıyla önemli sonuçlar alınabilmektedir. SLS'in toksik doza ulaşp, membran yapısını bozma riskinden dolayı permeabilite arttırıcı olarak biyoyumlu çeşitli safra tuzları (Sodyum taurokolat, sodyum tauroglukolat vb.) ile yeni çalışmalar yürütülebilir.
- Sonuç olarak SAME, yıllardır bilinen, vücudumuzda ATP'den sonra en çok kullanılan ikinci substrattır; ama üzerinde yapılan çalışmalar son derece azdır. Bu çalışmayla literatüre önemli bir katkı sağlayacağımızı düşünüyoruz.

ÖZET

S-Adenozil-L-Metiyonin'in Oral Yolla Verilişte Biyoyararlanımını Artırmak İçin Formülasyon Yaklaşımları: İn Vitro Ve İn Vivo Değerlendirilmeleri

S-adenozil-L-metiyonin (SAME) vücutta tüm hücrelerde doğal olarak bulunan metil donörüdür. Vücutta başta metilasyon olmak üzere birçok kimyasal reaksiyonda rol almaktadır. 1973 Yılına dayanan klinik çalışmalara göre depresyonlu hastalarda beyin omurilik sıvısında SAME oranının düşük olduğu ve oral veya parenteral SAME uygulamasıyla bu molekülün beyne geçerek antidepresan etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Yapılan birçok çalışma sonunda SAME'nin tedavide tek başına etkili olabildiği gibi konvansiyonel antidepresanların etkilerini potansiyalize etmek için kombine olarak da kullanılabileceği tespit edilmiştir. Psikiyatrik rahatsızlıklarda önerilen SAME dozu genel olarak 800-1600 mg/gündür. Fakat gastrointestinal sistemde degradasyona uğraması, karaciğerde ilk geçiş etkisine uğraması ve düşük permeabilitesinden dolayı dozun yaklaşık %1'i sistemik dolaşıma geçebilmektedir.

Bu veriler ışığında planlanan tezde, oral yolla verilecek SAME'nin biyoyararlanımını artırmak için ilk geçiş etkisi büyük oranda elimine edildiğinden, SAME'nin kolondan absorpsiyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla prebiyotik etkili ve kolon-spesifik degrade olan inülin ve pektin ile biyoadeziv etkili ve kolonda sıkı birleşim yerlerini (tight junction) açarak permeabiliteyi artıran kitozan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Tez kapsamında SAME yüklü nanopartiküller, in vitro testlerle karakterize edilmiştir. Uygun bulunan nanopartiküller akışkan yatak teknolojisi kullanılarak inert pelletler üzerine tabaka şeklinde yüklendikten sonra enterik polimerlerle kaplanmıştır. Sonuçta seçilen formülasyonların in vivo olarak sıçanlara oral yolla verilişlerini takiben SAME'nin farmakokinetik özellikleri incelenmiştir. Elde edilen verilere göre SAME'nin çözeltiye göre bağlı biyoyararlanımı, inülin ve pektin nanopartikülleri için % 128 ve %18; inulin ve pektin nanopartikülleri ile kaplı pelletler için ise % 383 ve %260 olmuştur. Sonuç olarak nanopartiküler formüller ve fonksiyonel kaplama, başarı ile etkin maddenin kolona hedeflenerek biyoyararlanımının artmasını sağlamıştır.

Anahtar Sözcükler: S-adenozilmetiyonin, Pektin, İnülin, Nanopartikül, İlaç

SUMMARY

Formulation Approaches for Oral Bioavailability Enhancement of S-Adenosylmethionine: In Vitro and In Vivo Evaluation

S-adenosyl-L-methionine (SAME) is an endogenic methyl donor naturally present in all cells. It is involved in many chemical reactions primarily in methylation. Based on the clinical studies in 1973, it was found that SAME levels in the cerebrospinal fluid of depressed patients were low and it was proved that upon its oral or parenteral applications, SAME has demonstrated antidepressant activity by the passage of this molecule to the brain. According to multiple studies on SAME, it was approved that SAME can be used in monotherapies alone or combined with conventional antidepressants to potentiate their effects. The recommended dosage of SAME in psychiatric disorders is 800-1600 mg/day. However, due to the degradation in the gastrointestinal system (GIS), the first-pass effect in the liver and low permeability, only 1% of the administered dose can reach the systemic circulation.

In this thesis which was planned in the light of this knowledge, it was intended to increase the bioavailability of oral SAME by providing its absorption from colon so that the first pass effect could be substantially eliminated. To achieve this goal effectively, it was planned to prepare nanoparticle formulations of SAME with pectin and inulin which can degrade in colon and possess prebiotic activity. Besides bioadhesive chitosan nanoparticles which modulate drug permeability via opening tight junctions were prepared. In the scope of the thesis SAME loaded nanoparticles were characterized by the in vitro tests. Selected nanoparticle formulations were converted into granules or loaded on inert pellets and coated with enteric polymers using fluidized bed technology. Finally, the pharmacokinetic properties of SAME were evaluated following oral administration of selected formulations to rats in vivo. According to the obtained data, SAME relative bioavailabilities were 128 and 184 % for inulin and pectin nanoparticles and, 383 and 260% for inulin and pectin coated pellets compared to SAME solution. As a result, nanoparticle formulations and functional coating successfully targeted the drug to colon and provided enhanced bioavailability.

Keywords: S-adenosylmethionine, Pectin, Inulin, Nanoparticle, Drug

KAYNAKLAR

- AKHGARI A, FARAHMAND F, GAREKANI HA, SADEGHIA S, VANDAMME TF (2006). Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **28(4)**: 307-314.
- ALKHADER E, BILLA N, ROBERTS CJ (2017). Mucoadhesive Chitosan-Pectinate Nanoparticles for the Delivery of Curcumin to the Colon. *AAPS PharmSciTech*, **18(4)**: 1009-1018. doi:10.1208/s12249-016-0623-y
- ANCARANI E, BIONDI, B., BOLLETTA, A., CESTRA, D., DE BELLA, E., NIRCHI, M.A., NUCERA, G., ORLANDI, N., PERSICHETTI, S., SCACCIA, F., SONSINI, U., TACCONE-GALLUCCI, M. (1993). Major depression complicating hemodialysis in patients with chronic renal failure: A multicenter, double-blind, controlled clinical trial of S-adenosyl-L-methionine versus placebo. *Current Therapeutic Research*, **54(6)**: 680-686.
- ANTZAA C, STABOULIB S, KOTSISA V (2018). Gut microbiota in kidney disease and hypertension. *Pharmacological Research*, **130**: 198-203. doi:10.1016/j.phrs.2018.02.028
- ARSLAN T. (2012). X-ışınları ve kullanım alanları. Yakın Doğu Üniversitesi.
- ASFOUR MH, MOHSEN AM (2018). Formulation and evaluation of pH-sensitive rutin nanospheres against colon carcinoma using HCT-116 cell line. *J Adv Res*, **9**: 17-26. doi:10.1016/j.jare.2017.10.003
- ASLAN N (1994). Pektinin Fizikokimyasal Özellikleri, Üretimi ve Gıdalarda Kullanımı. *Gıda*, **19(3)**: 187-192.
- BADDAY BA, GUPTA AVSSKS, BEDDAI AA, NAIK MT (2014). Experimental Study on the Bed Voidage and Minimum Fluidization Velocity of Gas-Solid Fluidization under Different Conditions. *IPASJ International Journal of Mechanical Engineering (IIJME)*, **2(7)**: 22-26.
- BALTARU D, BILEGAN A, COŞERIU A, PAPACHRŞSTOS V, MUREŞAN A, CHIŞ I (2013). THE EFFECTS OF CHITOSAN IN ALLEVIATING PAIN AND OXIDATIVE STRESS IN A RAT MODEL OF ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS. *Rev.Med.Chir.Soc.Med.Nat.*, **117(2)**.
- BARCLAY T, GINIC-MARKOVIC M, COOPER P, PETROVSKY N (2010). Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *J. Excipients and Food Chem.*, **1(3)**: 27-50.
- BAUTZOVA T, RABISKOVA M, BEDUNEAU A, PELLEQUER Y, LAMPRECHT A (2012). Bioadhesive pellets increase local 5-aminosalicylic acid concentration in experimental colitis. *Eur J Pharm Biopharm*, **81(2)**: 379-385. doi:10.1016/j.ejpb.2012.02.011

- BAYINDIR ZS, YÜKSEL N (2015). Provesicles as Novel Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **16**: 344-364.
- BHAKAY A, RAHMAN M, DAVE RN, BILGILI E (2018). Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs via Nanocomposites: Formulation(-)Processing Aspects and Challenges. *Pharmaceutics*, **10(3)**. doi:10.3390/pharmaceutics10030086
- BİLENSOY E. (2014). Nanopartiküller. In: *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları* Ed.: Zırh-Gürsoy, A., İstanbul.
- BİLENSOY E, SARISOZEN C, ESENDAGLI G, DOĞAN AL, AKTAS Y, SEN M, MÜNGAN NA (2009). Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors. *Int J Pharm*, **371(1-2)**: 170-176. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.12.015
- BODNAR M, HARTMANN JF, BORBELY J (2005). Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanoparticles. *Biomacromolecules*, **6**: 2521-2527.
- BORA G, YURTER, H.E. (2007). Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **38**: 48-54.
- BOTTIGLIERI T (2002). S-Adenosyl-L-methionine (SAME): from the bench to the bedside--molecular basis of a pleiotrophic molecule. *Am J Clin Nutr.*, **76(5)**: 1151-1157.
- BOUDRY G (2005). The Ussing chamber technique to evaluate alternatives to in-feed antibiotics for young pigs. *Anim. Res.*, **54**: 2019-2230. doi:10.1051/animres:2005014
- BOZKIR A, DEVRİM, B. (2015). Design and Evaluation of Hydrophobic Ion-Pairing Complexation of Lysozyme with Sodium Dodecyl Sulfate for Improved Encapsulation of Hydrophilic Peptides/Proteins by Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, **06(01)**. doi:10.4172/2157-7439.1000259
- BROSNAN JT, BROSNAN, M.E. (2006). The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *J Nutr.*, **136(6)**: 1636-1640.
- BULL MJ, PLUMMER NT (2014). Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integrative Medicine*, **13(6)**.
- CANNON LM, BUTLER, F. N., WAN, W., ZHAOHUI, S.Z. (2002). A stereospecific colorimetric assay for (S,S)-adenosylmethionine quantification based on thiopurine methyltransferase-catalyzed thiol methylation. *Analytical Biochemistry*(**308**): 358-363.
- CANO-CEBRIÁN MJ, ZORNOZA T, GRANERO L, POLACHE A (2005). Intestinal Absorption Enhancement Via the Paracellular Route by Fatty Acids, Chitosans and Others: A Target for Drug Delivery. *Current Drug Delivery*, **2**: 9-22.

- CANTONI GL (1952). THE NATURE OF THE ACTIVE METHYL DONOR FORMED ENZYMATICALY FROM L-METHIONINE AND ADENOSINETRIPHOSPHATE. *J. Am. Chem. Soc.*, **74(11)**: 2942–2943.
- CARABOTTIA M, SCIROCCOA A, MASELLI MA, SEVERIA C (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology*, **28**: 1-7.
- CARUSO I, FUMAGALLI, M., BOCCASSINI, L., PUTTINI, P.S., GINISELLI, G., CAVALLARI, G. (1984). ANTIDEPRESSANT ACTIVITY OF S-ADENOSYLMETHIONINE. *The Lancet*, **323(8382)**: 904.
- CHANDRA A, CHANDRA, A. , THAKUR, A. (2013). Synthesis and ion conduction mechanism on hot-pressed sodium ion conducting nano composite polymer electrolytes. *Arabian Journal of Chemistry*. doi:10.1016/j.arabjc.2013.07.014
- CHARLTON ST, DAVIS SS, ILLUM L (2007). Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: in vitro characterisation studies. *J Control Release*, **118(2)**: 225-234. doi:10.1016/j.jconrel.2006.12.014
- CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (CDER). "Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods"
Erişim adresi :<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>
Son erişim tarihi: 30/03/2019.
- CERUTTI R., M. PERIN, P. GRUSSU, O. ZULIAN (1993). Psychological distress during puerperium: A novel therapeutic approach using S-adenosylmethionine. *Current Therapeutic Research*, **53(6)**: 707-706.
- CHEN RH, HWAB H (1996). Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate Polymers*, **29**: 353-358.
- CHEN X, MURAWSKI A, HLADIK L, CRESPI CL. (2012). A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA Model
- CHIANG PK, GORDON R.K.,TAL J., ZENG G.C., DOCTOR B.P., PARDHASARADHI K., MCCANN P.P. (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.*, **10(4)**: 471-480.
- CHITTASUPHO C, JATURANPINYO, M., MANGMOOL, S. (2013). Pectin nanoparticle enhances cytotoxicity of methotrexate against hepG2 cells. *Drug Deliv.*, **20(1)**: 1-9.
- CHOMCHARN N, XANTHOS, M. (2013). Properties of aspirin modified enteric polymer prepared by hot-melt mixing. *International Journal of Pharmaceutics*, **450(2013)**: 259-267.
- COCO R, PLAPIED L, POURCELLE V, JEROME C, BRAYDEN DJ, SCHNEIDER YJ, PREAT V (2013). Drug delivery to inflamed colon by nanoparticles: comparison of different strategies. *Int J Pharm*, **440(1)**: 3-12. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.07.017

- COELHO TC, LAUS R, MANGRICH AS, DE FÁVERE VT, LARANJEIRA MCM (2007). Effect of heparin coating on epichlorohydrin cross-linked chitosan microspheres on the adsorption of copper (II) ions. *Reactive and Functional Polymers*, **67(5)**: 468-475. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2007.02.009
- COLE GC. (2002). Coating pans and coating columns. In: *Pharmaceutical Coating Technology* Ed.: Cole, G., UK: Taylor&Francis.
- CORCORAN CD, THOMAS P, PHILLIPS J, O'KEANE V (2006). Vagus nerve stimulation in chronic treatment-resistant depression. *British Journal Of Psychiatry*, **189**: 282-283.
- CRICONIA AM, ARAQUISTAIN, J.M, DAFFINÀ, N., NAVAJAS, F., BORDINO, M. (1994). Results of treatment with s-adenosyl-l-methionine in patients with major depression and internal illnesses. *Current Therapeutic Research*, **55(6)**: 666-674.
- DA COSTA MA, SEICEIRA, R.C., RODRIGUES, C.R., HOFFMEISTER, C.R.D., CABRAL, L.M., ROCHA, H.V.A. (2013). Efavirenz Dissolution Enhancement I: Co-Micronization. *Pharmaceutics*, **5**: 1-22.
- DAI T, TANAKA M, HUANG YY, HAMBLIN MR (2011). Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **9(7)**: 857-879. doi:10.1586/eri.11.59
- DE ANDRADE DF, DE OLIVEIRA EG, RAFFINPOHLMANN A, GUTERRES SS, KÜLKAMP-GUERREIRO IC, BECK RCR (2018). Fluid bed granulation as an innovative process to produce dry redispersible nanocapsules: Influence of cationic coating of particles. *Powder Technology*, **326**: 25-31. doi:10.1016/j.powtec.2017.12.048
- DELLE CD, ILISSO CP, MOSCA L, PAGANO M, MARTINO E, PORCELLI M, CACCIAPUOTI G (2017). The Anticancer Effects of S-Adenosylmethionine on Breast Cancer Cells. *JSM Chem*, **5(3)**: 1049.
- DELLE CHIAIE R, PANCHERI, P., SCAPICCHIO, P. (2002). Efficacy and tolerability of oral and intramuscular S-adenosyl-L-methionine 1,4-butanedisulfonate (S-AMe) in the treatment of major depression: comparison with imipramine in 2 multicenter studies. *Am J Clin Nutr.*, **76(5)**: 1172-1176.
- DEMIRBOLAT GM, ALTINTAŞ L, YILMAZ Ş, DEĞİM İT (2018). Development of Orally Applicable, Combinatorial Drug-Loaded Nanoparticles for the Treatment of Fibrosarcoma. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, **107(5)**: 1398-1407.
- DESHPANDE. PB, SENTHILKUMAR, U.P., GANESAN, S. . (2001).
- DESIDERIO C, CAVALLARO RA, DE ROSSI A, D'ANSELMIS F, FUSO A, SCARPA S (2005). Evaluation of chemical and diastereoisomeric stability of S-adenosylmethionine in aqueous solution by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*, **38(3)**: 449-456. doi:10.1016/j.jpba.2005.01.041

- DEWETTINCK K, HUYGHEBAERT A (1998). Top-Spray Fluidized Bed Coating: Effect of Process Variables on Coating Efficiency. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **31**: 568-575.
- DIXIT R, PUTHLI, S., (2009). Fluidization technologies: Aerodynamic principles and process engineering. *J Pharm Sci*, **98(11)**: 3933-3960.
- DORDING CM, MISCHOULON, D., SHYU, I. , ALPERT, J.E. , PAPAKOSTAS ,G.I. (2012). SAME and sexual functioning. *Eur Psychiatry.*, **27(6)**: 451-454.
- DORTUNÇ B. (2004). Kaplı Dozaj Şekilleri. In: *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri* Ed.: Zırh-Gürsoy, A.
- DU Y, ZHAO Y, DAI S, YANG B (2009). Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**: 103-107. doi:10.1016/j.ifset.2008.07.004
- DUTTA RK, SAHU S (2012). Development of oxaliplatin encapsulated in magnetic nanocarriers of pectin as a potential targeted drug delivery for cancer therapy. *Results Pharma Sci*, **2**: 38-45. doi:10.1016/j.rinphs.2012.05.001
- DÜZ M. (2018). *Termal Analiz Metotları*. Afyon Kocatepe Üniversitesi.
- EVANS DF, PYE G, BRAMLEY R, CLARK AG, DYSON TJ, HARDCASTLE JD (1998). Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects *Gut*, **29**: 1035-1041.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. "ICH Topic Q 2 (R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology: Note For Guidance On Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology".
Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
Son erişim tarihi: 30/03/2019.
- EVONIK INDUSTRIES " PlasACRYL™ T20 for use with EUDRAGIT® aqueous-based acrylic polymers"
Erişim adresi: <https://emersonresources.com/wp-content/uploads/2016/12/Plasacryl-t20-Evonik-Brochure.pdf>
Son erişim tarihi: 30/03/2019.
- FARSHI A (2013). EXPERIMENTAL MEASUREMENT OF DIFFERENT FLUIDIZATION PARAMETERS. *Petroleum & Coal*, **55(4)**: 311-321.
- FIECCHI A (1975). SALT OF S-ADENOSYL-L-METHIONINE AND PROCESS OF PREPARATION. *United States Patent*.
- FARES MM, SALEM, M.S. (2015). Dissolution enhancement of curcumin via curcumin–prebiotic inulin nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm*, **41(11)**: 1785-1792. doi:10.3109/03639045.2015.1004184
- FAZIO C, ANDREOLI, V., AGNOLI, A. , CASACCHIA, M. , CERBO , R. (1973). Therapeutic effects and mechanism of action of S-adenosyl-L-methionine (SAM) in depressive syndromes. *Minerva Med*, **64(29)**: 1515-1529.

- FONTECAVE M, ATTA, M., MULLIEZ, E. (2004). S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci.*, **29(5)**: 243-249.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. " APPENDIX 1 – ORA Validation and Verification Guidance for Human Drug Analytical Methods ".
Erişim adresi:
<https://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM173090.pdf>
Son erişim tarihi: 30 Ekim 2018.
- FRIEDRICH RB, FONTANA, M.C., BASTOS, M.O., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S., BECK, R.C. (2010). Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: the wet granulation process as a promising approach. *J Nanosci Nanotechnol.*, **10(1)**: 616-621.
- GALA RP, KHAN I, ELHISSI AM, ALHNAN MA (2015). A comprehensive production method of self-cryoprotected nano-liposome powders. *Int J Pharm*, **486(1-2)**: 153-158. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.03.038
- GAO R, GAO Z, HUANG L, QIN H (2017). Gut microbiota and colorectal cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **36(5)**: 757-769. doi:10.1007/s10096-016-2881-8
- GARCÍA-TREVIJANO ER, LATASA, M.U. , CARRETERO, M.V., BERASAIN C., MATO, J.M. , AVILA,M.A. (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 J.*, **14(15)**: 2511-2518.
- GASTER B (1999). S-adenosylmethionine (SAmE) for Treatment of Depression *Integrative Medicine*, **2**: 133-135.
- GAZZANIGA A. (2013). *Formulation Approaches to Colon Delivery: an Overview*. Paper presented at the 3rd Conference on “Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery”.
- GENNARI F (1984). Stable sulpho-adenosyl-L-Methionine (Same) salts, particularly suitable for oral pharmaceutical use.
- GIBSON GR, ROBERFROID, M.B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J Nutr.*, **125(6)**: 1401-1412.
- GIRIDHAR RS, PANDIT, A.S. (2013). Effect of Curing Agent on Sodium Alginate Blends Using Barium Chloride as Crosslinking Agent and Study of Swelling, Thermal, and Morphological Properties. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **62**: 743-748.
- GIULIDORI P, CORTELLARO, M., MOREO, G., STRAMENTINOLI, G. (1984). Pharmacokinetics of S-adenosyl-L-methionine in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.*, **27(1)**: 119-121.

- GÖKÇE AG. (2012). *Kristallerde X-Işını, Nötron ve Elektron Kırınımı*. Dokuz Eylül Üniversitesi.
- GÖREN JL, STOLL, A.L., DAMICO, K.E., SARMIENTO, I.A., COHEN, B.M. (2004). Bioavailability and lack of toxicity of S-adenosyl-L-methionine (SAME) in humans. *Pharmacotherapy*, **24(11)**: 1501-1507.
- GREGERSEN T, HAASE AH, SCHLAGETER V, GRONBAEK H, KROGH K (2015). Regional Gastrointestinal Transit Times in Patients With Carcinoid Diarrhea: Assessment With the Novel 3D-Transit System. *J Neurogastroenterol Motil*, **21**: 423-432. doi:10.5056/jnm15035
- GRUENWALD J, GRAUBAUM HJ, HARDE A (2002). Effect of a probiotic multivitamin compound on stress and exhaustion. *Adv Ther.*, **19(3)**: 141-150.
- GUARNER F, MALAGELADA JR (2003). Gut flora in health and disease. *THE LANCET*, **360**. doi:10.1016/S0140-6736(03)12489-0
- GUCHHAIT RB, MONJAN, A.A. (1981). Circadian Rhythm in Pineal Methionine S-Adenosyltransferase *J Neurochem.*, **36(6)**: 2092-2093.
- GUPTA KC, JABRAIL FH (2007). Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled release of centchroman. *Carbohydr Res*, **342(15)**: 2244-2252. doi:10.1016/j.carres.2007.06.009
- GUPTA RK, KAUR I, NAG TC, CHHABLANI J (2018). Diagnostic Electron Microscopy of Retina. *Semin Ophthalmol*, **33(5)**: 700-710. doi:10.1080/08820538.2017.1416415
- GUPTA VK, BECKERT TE, PRICE JC (2001). A novel pH- and time-based multi-unit potential colonic drug delivery system. I. Development. *International Journal of Pharmaceutics*, **213(2001)**: 83-91.
- HIRAYAMA F, MINAMI K, UEKAMA K (1996). In-vitro Evaluation of Biphenyl Acetic Acid-P-Cyclodextrin Conjugates as Colon-targeting prodrugs: Drug Release Behaviour in Rat Biological Media. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**: 27-31.
- HUANG H, ZOU Y, CHI Y (2018). Quantitative assessment of the effects of chitosan intervention on blood pressure control. *Drug Design, Development and Therapy*, **12**. doi:10.2147/DDDT.S148064
- ICHIKAWA H, FUKUMORI Y. (1991). Design and Formation of Composite Particle. In: *Powder Technology Handbook* Ed.: Masuda, H., Higashitani, K., Yoshida, H.: Taylor&Francis Publisher.
- INTERNATIONAL PECTIN PRODUCER ASSOCIATION . (2019). Specification for Pectins. Erişim adresi: [https://ippa.info/specification_for_pectins.htm]. Erişim Tarihi:6/2/2019
- INTERNATIONAL CENTER OF HARMONIZATION. "Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology".

Erişim adresi: https://www.geinstruments.com/sites/default/files/pdf_test/reg_ICH_2_QB_validation_of_analytical_procedures_methodology.pdf
Son erişim tarihi: 30/03/2019.

- INTERNATIONAL CENTER OF HARMONIZATION Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95), (June/ 1995).
- JAFFER S, SAMPALIS JS (2007). Efficacy and Safety of Chitosan HEP-40™ in the Management of Hypercholesterolemia: A Randomized, Multicenter, Placebo-controlled Trial. *Alternative Medicine Review*, **12(3)**.
- JAHANBAN-ESFAHLAN A, DASTMALCHI, S., DAVARAN, S. (2016). A simple improved desolvation method for the rapid preparation of albumin nanoparticles. *Int J Biol Macromol*, **91**: 703-709. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.05.032
- JAIN AK, SOOD V, BORA M, VASITA R, KATTI DS (2014). Electrosprayed inulin microparticles for microbiota triggered targeting of colon. *Carbohydr Polym*, **112**: 225-234. doi:10.1016/j.carbpol.2014.05.087
- JAIN SK, JAIN A, GUPTA Y, JAIN A, KHARE P, KANNANDASAN M (2008). Targeted delivery of 5-ASA to colon using chitosan hydrogel microspheres. *J. DRUG DEL. SCI. TECH.*, **18(5)**: 315-321. doi:10.1016/S1773-2247(08)50062-1
- JANES AK, FRESNEAU, M.P., MARAZUELA, A., FABRA, A., ALONSO, M.J. (2001). Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, **73**: 255-267.
- JONASSEN H, TREVES A, KJONIKSEN AL, SMISTAD G, HIORTH M (2013). Preparation of ionically cross-linked pectin nanoparticles in the presence of chlorides of divalent and monovalent cations. *Biomacromolecules*, **14(10)**: 3523-3531. doi:10.1021/bm4008474
- JONES DM (1988). Controlling Particle Size and Release Properties-Secondary Processing Techniques. *American Chemical Society*, **Chapter 17**.
- JONES OG, LESMES U, DUBIN P, MCCLEMENTS DJ (2010). Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin-pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, **24(4)**: 374-383. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.11.003
- JOSE PA, RAJ D (2015). Gut microbiota in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **24(5)**: 403-409. doi:10.1097/MNH.000000000000149
- KAFSHGARI MH, KHORRAM M, MANSOURI M, SAMIMI A, OSFOURI S (2012). Preparation of alginate and chitosan nanoparticles using a new reverse micellar system. *Iran Polym J*, **21**: 99-107. doi:10.1007/s13726-011-0010-1
- KAHYA N (2018). Water Soluble Chitosan Derivatives and their Biological Activities: A Review. *Polymer Sciences*, **4(2)**: 16. doi:10.4172/2471-9935.100043

- KANSY M, SENNER F, GUBERNATOR K (1998). Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes." *J Med Chem*, **26(41)**: 1007-1010.
- KARNCHANAJINDANUN J, SRISA-ARD M, SRIHANAM P, BAIMARK Y (2010). Preparation and characterization of genipin-cross-linked chitosan microparticles by water-in-oil emulsion solvent diffusion method. *Natural Science*, **2 (10)**: 1061-1065. doi:10.4236/ns.2010.210131
- KASHI TS, ESKANDARION, S., ESFANDYARI-MANESH, M., MARASHI, S. M., SAMADI, N., FATEMI, S. M., ATYABI, F., ESHRAGHI, S., DINARVAND, R. (2012). Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *Int J Nanomedicine*, **7**: 221-234. doi:10.2147/IJN.S27709
- KASZUBA M. (2015). Dynamic Light Scattering
- KEDDIE J. (2005). Film Formation of Waterborne Coating. Erişim: [\[https://www.slideserve.com/yaakov/film-formation-of-waterborne-coatings\]](https://www.slideserve.com/yaakov/film-formation-of-waterborne-coatings). Erişim Tarihi: 29.04.2019
- KERNS EH, DI L, PETUSKY S, FARRIS M, LEY R, JUPP P (2004). Combined Application of Parallel Artificial Membrane Permeability Assay and Caco-2 Permeability Assays in Drug Discovery. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, **93(6)**: 1440-1453.
- KIM H, JEON H, KONG H, YANG Y, CHOI B, KIM YM, NECKERS L, JUNG Y (2006). A molecular mechanism for the anti-inflammatory effect of taurine-conjugated 5-aminosalicylic acid in inflamed colon. *Mol Pharmacol*, **69(4)**: 1405-1412. doi:10.1124/mol.105.020578
- KÖNIG B (1987). A long-term (two years) clinical trial with S-adenosylmethionine for the treatment of osteoarthritis. *The American Journal of Medicine*, **83(5-1)**: 89-94.
- KRIJT J, DUTÁ, A., KOZICH, V. (2009). Determination of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine by LC-MS/MS and evaluation of their stability in mice tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **877(22)**: 2061-2066.
- KRIVOROTOVA T, STANEVICIENE, R., LUKSA, R., SERVIENE, E., SEREIKAIT, J. (2016). Preparation and characterization of nisin-loaded pectin-inulin particles as antimicrobials. *LWT - Food Science and Technology*, **72**: 518-524.
- LAMPRECHT A, SCHÄFER U, LEHR CM (2001). Size-Dependent Bioadhesion of Micro- and Nanoparticulate Carriers to the Inflamed Colonic Mucosa. *Pharmaceutical Research*, **18(6)**: 788-793. doi:10.1023/a:1011032328064
- LEI Y, LU Y, QI J, NIE S, HU F, PAN W, WU W (2011). Solid self-nanoemulsifying cyclosporin A pellets prepared by fluid-bed coating: preparation, characterization

- and in vitro redispersibility. *Int J Nanomedicine*, **6**: 795-805. doi:10.2147/IJN.S17711
- LEONESA R, BOTELHOB, M.B.S., SENTANIN, F., CESARINOC, I., PAWLICKAC, A., CAMARGOD, A.S.S., SILVAD, M.M. (2014). Pectin-based polymer electrolytes with Ir(III) complexes. *Mole. Cryst. Liq. Cryst.*, **604**: 117-125. doi:10.1080/15421406.2014.968049
- LEV KOVITZ Y, ALPERT J.E., BRINTZ C.E., MISCHOULON D., PAPA KOSTAS G.I. (2012). Effects of S-adenosylmethionine augmentation of serotonin-reuptake inhibitor antidepressants on cognitive symptoms of major depressive disorder. *J Affect Disord.*, **136**(3): 1174-1178.
- LI FQ, SU H, WANG J, LIU JY, ZHU QG, FEI YB, PAN YH, HU JH (2008). Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for liver targeting. *Int J Pharm*, **349**(1-2): 274-282. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.08.001
- LIDDELL HG, SCOTT R. (2019). *A Greek-English Lexicon*. Retrieved from <http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.04.0057%3Aentry%3D%2382916&redirect=true>.
- LIU LS, FISHMAN ML, HICKS KB (2006). Pectin in controlled drug delivery – a review. *Cellulose*, **14**(1): 15-24. doi:10.1007/s10570-006-9095-7
- LOPEZ-MOLINA D, CHAZARRA S, HOW CW, PRUIDZE N, NAVARRO-PERAN E, GARCIA-CANOVAS F, GARCIA-RUIZ PA, ROJAS-MELGAREJO F, RODRIGUEZ-LOPEZ JN (2015). Cinnamate of inulin as a vehicle for delivery of colonic drugs. *Int J Pharm*, **479**(1): 96-102. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.064
- LOZOYA-AGULLO I, GONZÁLEZ-ÁLVAREZ I, GONZÁLEZ-ÁLVAREZ M, MERINO-SANJUÁN M, BERMEJO M (2016). Development of an ion-pair to improve the colon permeability of a low permeability drug: Atenolol. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **93**: 334-340. doi:10.1016/j.ejps.2016.08.035
- LUO J, LI Y, WANG F, ZHANG W, GENG X (2010). S-Adenosylmethionine Inhibits the Growth of Cancer Cells by Reversing the Hypomethylation Status of c-myc and H-ras in Human Gastric Cancer and Colon Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, **6**(7): 784-795.
- LUO Z, LIU Y, ZHAO B, TANG M, DONG H, ZHANG L, LV B, WEI L (2013). Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **68**(2): 208-216. doi:10.1016/j.vascn.2013.06.001
- LUQUE-ALCARAZ AG, LIZARDI-MENDOZA, J., GOYCOOLEA, F. M., HIGUERA-CIAPARA, I., ARGÜELLES-MONAL, W. (2016). Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. *RSC Adv.*, **6**(64): 59250-59256. doi:10.1039/c6ra06563e
- MACDONALD D, HARRISON, N., TAKACS-COX, A., PURAC, A., BLAZEK-WELSH, A. (2011).

- MAGESH B, M. CHANDRASEKHAR, SASTRY P, MURUGAN S, SIVAKUMAR, B. (2012). A Validated Stability Indicating RP-LC Method for the Determination of Related Impurities in S-Adenosyl-L-Methionine (SAME) API. *Der Pharma Chemica*, **4(6)**: 2327-2332.
- MAHMOOD N, CHEISHVILI D, ARAKELIAN A, TANVIR KHAN I, PÉPIN A, SZYF M, S.A. R (2018). Methyl donor S-adenosylmethionine (SAM) supplementation attenuates breast cancer growth, invasion, and metastasis in vivo; therapeutic and chemopreventive applications. *Oncotarget*, **9(4)**: 5169-5183.
- MALVERN INSTRUMENTS LTD (2011). DYNAMIC LIGHT SCATTERING COMMON TERMS DEFINED.
- MALVERN INSTRUMENTS LTD. (2013). Zetasizer Nano User Manual
- MALVERN INSTRUMENTS LTD. Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes. Erişim Adresi: [\[https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/intro_to_dls.pdf\]](https://warwick.ac.uk/fac/cross_fac/sciencecity/programmes/internal/themes/am2/booking/particlesize/intro_to_dls.pdf). Erişim Tarihi: 6/2/2019
- MAO H, ROY K, TROUNG-LE VL, JAMES KA, LIN KY, WANG Y, AUGUST T, LEONG KW (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, **70**: 399-421.
- MARONI A, DEL CURTO MD, ZEMA L, FOPPOLI A, GAZZANIGA A (2013). Film coatings for oral colon delivery. *Int J Pharm*, **457(2)**: 372-394. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.043
- MARONI A, ZEMA L, DEL CURTO MD, FOPPOLI A, GAZZANIGA A (2012). Oral colon delivery of insulin with the aid of functional adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*, **64(6)**: 540-556. doi:10.1016/j.addr.2011.10.006
- MARQUES MRC, LOEBENBERG, R., ALMUKAINZI, M. (2011). Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies*, **18(3)**: 15-28. doi:10.14227/dt180311p15
- MCKINNON M. (2014). Thermogravimetric Analysis (TGA) & Differential Scanning Calorimetry (DSC). Erişim Tarihi:
- MCMILLAN JM, WALLE, U.K., WALLE , T. (2005). S-adenosyl-L-methionine: transcellular transport and uptake by Caco-2 cells and hepatocytes. *J Pharm Pharmacol*, **57(5)**: 599-605.
- MENSINK MA, FRIJLINK HW, VAN DER VOORT MAARSCHALK K, HINRICHS WL (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. *Carbohydr Polym*, **134**: 418-428. doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.022

- MERISKO-LIVERSIDGE EM, LIVERSIDGE GG (2008). Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicol Pathol*, **36(1)**: 43-48. doi:10.1177/0192623307310946
- MILLER AL (2008). The Methylation, Neurotransmitter, and Antioxidant Connections Between Folate and Depression *Altern Med Rev.*, **13(3)**: 216-226.
- MINKO T (2004). Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**: 491-509. doi:10.1016/j.addr.2003.10.017
- MORANA A, DI LERNIA, I., CARTENÌ, 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.
- MUNZEL P, KOSCHEL, K. (1982). Alteration in phospholipid methylation and impairment of signal transmission in persistently paramyxovirus-infected C6 rat glioma cells. *Proc Natl Acad Sci*, **79(12)**: 3692-3696.
- NANOTECHNOLOGY INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL HEALTH. (2019). Nanotechnology. Erişim: [<http://www.nioh.ac.za/topics/nanotechnology/>]. Erişim Tarihi: 01.05.2019
- NAEEM M, OSHI MA, KIM J, LEE J, CAO J, NURHASNI H, IM E, JUNG Y, YOO J (2018). pH-triggered surface charge-reversal nanoparticles alleviate experimental murine colitis via selective accumulation in inflamed colon regions. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **14**: 823-834. doi:10.1016/j.nano.2018.01.003
- NAGPAL R, WANG S, SOLBERG WOODS LC, SESHIE O, CHUNG ST, SHIVELY CA, REGISTER TC, CRAFT S, MCCLAIN DA, YADAV H (2018). Comparative Microbiome Signatures and Short-Chain Fatty Acids in Mouse, Rat, Non-human Primate, and Human Feces. *Front Microbiol*, **9**: 2897. doi:10.3389/fmicb.2018.02897
- NAKAGAWA K, KAGEMOTO M (2013). Characterization of casein-based nanoparticles formed upon freezing by in situ SAXS measurement. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **103**: 366-374. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.052
- NEPOLEAN R, NARAYANAN N, SUBRAMANIYAN N, VENKATESWARAN K, VINOTH J (2012). COLON TARGETED METHACRYLIC ACID COPOLYMERIC NANOPARTICLES FOR IMPROVED ORAL BIOAVAILABILITY OF NISOLDIPINE. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*. 2012; 3(8): 962-967., **3(8)**: 962-967.
- OGONCZYK D, SIEK M, GARSTECKI P (2011). Microfluidic formulation of pectin microbeads for encapsulation and controlled release of nanoparticles. *Biomicrofluidics*, **5(1)**: 13405. doi:10.1063/1.3569944
- ONOE S, YAMADA S, CHAN HK (2014). Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *Int J Nanomedicine*, **9**: 1025-1037. doi:10.2147/IJN.S38378

- OPANASOPIT P, APIRAKARAMWONG A, NGAWHIRUNPAT T, ROJANARATA T, RUKTANONCHAI U (2008). Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. *AAPS PharmSciTech*, **9(1)**: 67-74. doi:10.1208/s12249-007-9007-7
- OPANASOPIT P, APIRAKARAMWONG, A., NGAWHIRUNPAT, T., ROJANARATA, T., RUKTANONCHAI U. (2008). Development and Characterization of Pectinate Micro/Nanoparticles for Gene Delivery. *AAPS PharmSciTech*, **9(1)**: 67-74.
- ORELLANO MS, PORPORATTO C, SILBERB JJ, FALCONE R, CORREA NM (2017). AOT reverse micelles as versatile reaction media for chitosan nanoparticles synthesis. *Carbohydrate Polymers*, **171**: 85-93. doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.074
- OZKAN Y., TAS C., OZKAN C.K., BAYRAK Z., ESİM O., OZKAN S. (03/2011). İlaçların Analiz ve Kalite Kontrollerinde Kullanılan Analitik Yöntemlerin Geçerliliği (Validasyon). *Gülhane Askeri Tıp Akademisi*, **87**.
- OZKAZANC E, YUKSEL GUNEY, H., GUNER, S., ABACI, U. (2010). Morphological and Dielectric Properties of Barium Chloride-Filled Poly(vinylidene fluoride) Films *POLYMER COMPOSITES*: 1782-1789. doi:10.1002/pc.20970
10.1002/pc
- PADOVA C (1987). S-adenosylmethionine in the treatment of osteoarthritis. Review of the clinical studies. *Am J Med.*, **20(83)**: 60-65.
- PAHARIA A, YADAV AK, RAI; G., JAIN; S.K., PANCHOLI SS, AGRAWAL GP (2007). Eudragit-coated Pectin Microspheres of 5-Fluorouracil for Colon Targeting. *AAPS PharmSciTech*, **8(1)**.
- PAPAKOSTAS GI, MISCHOULON, D., SHYU, I., ALPERT, J.E., FAVA, M. (2010). S-adenosyl methionine (SAME) augmentation of serotonin reuptake inhibitors for antidepressant nonresponders with major depressive disorder: a double-blind, randomized clinical trial. *Am J Psychiatry*, **167(8)**: 942-948.
- PARKS LW, SCHLENK, F. (1958). The stability and hydrolysis of s-adenosylmethionine; isolation of s-ribosylmethionine. *J. Biol. Chem.*, **230**: 295-305.
- PATEL MM (2013). Colon targeting: an emerging frontier for oral insulin delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **10(6)**: 731-739. doi:10.1517/17425247.2013.782284
- PENG H, XIONG H, LI J, XIE M, LIU Y, BAI C, CHEN L (2010). Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol. *Food Chemistry*, **121(1)**: 23-28. doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.085
- PHARMACOLOGICAL SCIENCES DM. (2018). Gastrointestinal Ph And Transit Times. Erişim: [<https://www.pharmacologicalsciences.us/drug-metabolism-2/gastrointestinal-ph-and-transit-times.html>]. Erişim Tarihi: 29.04.2019
- PHARMASPRAY. (2019). Fluid-bed Spray Nozzles & lances. Erişim: [<http://www.pharmaspray.net/FBP-spray-nozzles.html>]. Erişim Tarihi: 01.05.2019

- POIRIER LA, WISE, C.K., DELONGCHAMP, R.R., SINHA, R. (2001). Blood Determinations of S-Adenosylmethionine, S-Adenosylhomocysteine, and Homocysteine: Correlations with Diet. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **10**: 649-655.
- POPPER CW (2013). Mood disorders in youth: exercise, light therapy, and pharmacologic complementary and integrative approaches. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, **22(3)**: 403-441.
- POULAIN ND, PERRIO, I., LASNE, C., PRUD'HOMME, M.C., NAKACHE, M.P. EVELYNE (2003). Microspheres based on inulin for the controlled release of serine protease inhibitors: preparation, characterization and in vitro release. *Journal of Controlled Release*, **92(1-2)**: 27-38. doi:10.1016/s0168-3659(03)00251-7
- POWLEY TL, PHILLIPS, R.J. (2002). Musings on the Wanderer: What's New in Our Understanding of Vago-Vagal Reflexes? I. Morphology and topography of vagal afferents innervating the GI tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **283**: 1217-1225.
- PRADO LB, HUBER SC, BARNABÉ A, BASSORA FDS, PAIXÃO DS, DURAN N, ANNICHINO-BIZZACCHI JM (2017). Characterization of PCL and Chitosan Nanoparticles as Carriers of Enoxaparin and Its Antithrombotic Effect in Animal Models of Venous Thrombosis. *Journal of Nanotechnology*, **2017**. doi:10.1155/2017/4925495
- PUSAPATI RT, RAO TV (2014). Fluidized bed processing: A review. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, **2(4)**: 130-1365.
- QAZVINI NT, ZINATLOO., S. (2011). Synthesis and characterization of gelatin nanoparticles using CDI/NHS as a non-toxic cross-linking system. *J Mater Sci Mater Med*, **22(1)**: 63-69. doi:10.1007/s10856-010-4178-2
- QIU WY, WANG YY, WANG M, YAN JK (2018). Construction, stability, and enhanced antioxidant activity of pectin-decorated selenium nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **170**: 692-700. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.07.003
- RHEE SH, POTHOUKAKIS C, MAYER EA (2009). Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **6(5)**: 306-314. doi:10.1038/nrgastro.2009.35
- ROY JH. (2006). Physical Characterization of Nanoparticles. In: *Nanoparticle Technology for Drug Delivery* Ed.: Gupta, R. B. B., K. U., Newyork/ ABD: Taylor & Francis Group.
- RUPONEN M, VISTI M, OJARINTA R, LAITINEN R (2018). Permeability of glibenclamide through a PAMPA membrane: The effect of co-amorphization. *Eur J Pharm Biopharm*, **129**: 247-256. doi:10.1016/j.ejpb.2018.06.007

- SAILAJA KA, AMARESHWAR P (2011). Preparation of bovine serum albumin loaded chitosan nanoparticle using reverse micelle method. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.
- SAMIEIA N, FOROUTANA SM, RAZIPOURC F, ZARGHIB A, SHAFATI A (2017). An investigation into the ability of alendronate ion pairs to increase oral absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, **527**: 184-190. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.042
- SAREMI S, 7, ATYABI F, AKHLAGHI SP, OSTAD SN, DINARVAND R (2011). Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: preparation, in vitro and ex vivo evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, **6**: 119-128. doi:10.2147/IJN.S15500
- SARRIS J, PAPA KOSTAS, G.I. , VITOLO, O. , FAVA, M. , MISCHOULON, D. (2014). S-adenosyl methionine (S-AMe) versus escitalopram and placebo in major depression RCT: efficacy and effects of histamine and carnitine as moderators of response. *J Affect Disord.*, **164**: 76-81.
- SCHIFANO F, GAROFOLI, F. (1993). Dothiepin vs. S-adenosylmethionine (S-AMe) for the treatment of major depression in weaned alcoholics: a pilot study. *European Neuropsychopharmacology*, **3(3)**: 330.
- SCHMIDT K, COWEN PJ, HARMER CJ, TZORTZIS G, ERRINGTON S, BURNET PW (2015). Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*, **232(10)**: 1793-1801. doi:10.1007/s00213-014-3810-0
- SEO PR, TEKSIN ZS, KAO JP, POLLI JE (2006). Lipid composition effect on permeability across PAMPA. *Eur J Pharm Sci*, **29(3-4)**: 259-268. doi:10.1016/j.ejps.2006.04.012
- SHABIR GA (May, 2004). A Practical Approach to Validation of HPLC Methods Under Current Good Manufacturing Practices. *Journal of Validation Technology*: 25-37.
- SHAHBAZI MA, SANTOS H (2013). Improving Oral Absorption Via Drug-Loaded Nanocarriers: Absorption Mechanisms, Intestinal Models and Rational Fabrication. *Current Drug Metabolism*, **14**: 28-56.
- SHAIKH MSI, DERLE ND, BHAMBER R (2012). Permeability Enhancement Techniques for Poorly Permeable Drugs: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2(6)**: 34-39. doi:10.7324/JAPS.2012.2705
- SHAW R. (2013). Dynamic Light Scattering Training Achieving reliable nano particle sizing <https://www.atascientific.com.au/wp-content/uploads/2017/01/DLS-training-course-details-2013.pdf>
- SHIPPY RA, MENDEZ, D., JONES, K., CERGNUL, I., KARPIAK, S.E. (2004). S-adenosylmethionine (SAM-e) for the treatment of depression in people living with HIV/AIDS *BMC Psychiatry*, **4(38)**.

- SHRIVASTAVA PK, SHRIVASTAVA A, SINHA SK, SHRIVASTAVA SK (2013). Dextran Carrier Macromolecules for Colon-specific Delivery of 5-Aminosalicylic Acid. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*: 277-283.
- SITARAM BR, SITARAM, M., TRAUT, M., CHAPMAN, C.B. (1995). Nyctohemeral rhythm in the levels of S-adenosylmethionine in the rat pineal gland and its relationship to melatonin biosynthesis. *J Neurochem*, **65**(4): 1887-1894.
- SQUILLANTE E, MANIAR, A., NEEDHAM, T., ZIA, H. (1998). Optimization of in vitro nifedipine penetration enhancement through hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics*, **169**: 143-154.
- SRIAMORNSAK P, KONTHONG, S., BURAPAPADH, K., SUNGTHONGJEEN, S. (2012). Drug-Loaded Pectin Microparticles Prepared by Emulsion-Solvent Evaporation. *Advanced Materials Research*, **506**: 282-285.
- SUBUDHI MB, JAIN A, JAIN A, HURKAT P, SHILPI S, GULBAKE A, JAIN SK (2015). Eudragit S100 Coated Citrus Pectin Nanoparticles for Colon Targeting of 5-Fluorouracil. *Materials (Basel)*, **8**(3): 832-849. doi:10.3390/ma8030832
- SUN YP, MEZIANI MJ, PATHAK P, QU L (2005). Polymeric nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution. *Chemistry*, **11**(5): 1366-1373. doi:10.1002/chem.200400422
- TAO Y, ZHANG H, GAO B, GUO J, HU Y, SU Z (2011). Water-Soluble Chitosan Nanoparticles Inhibit Hypercholesterolemia Induced by Feeding a High-Fat Diet in Male Sprague-Dawley Rats. *Journal of Nanomaterials*, **2011**. doi:10.1155/2011/814606
- TIAN Z, YI Y, YUAN H, HAN J, ZHANG X, XIE Y, LU Y, QI J, WU W (2013). Solidification of nanostructured lipid carriers (NLCs) onto pellets by fluid-bed coating: Preparation, in vitro characterization and bioavailability in dogs. *Powder Technology*, **247**: 120-127. doi:10.1016/j.powtec.2013.07.010
- TILKAN MG, ÖZDEMİR N (2018). Investigation of the parameters affecting the release of flurbiprofen from chitosan microspheres. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **53**(4). doi:10.1590/s2175-97902017000400242
- THAKUR B, AMARNATH CA, SAWANT SN (2014). Pectin coated polyaniline nanoparticles for an amperometric glucose biosensor. *RSC Adv.*, **4**: 40917-40923. doi:10.1039/C4RA05264A
- THE TOXIN AND TOXIN TARGET DATABASE. (2019). S-Adenosylmethionine (T3D4456). Erişim Adresi: [<http://www.t3db.ca/toxins/T3D4456>]. Erişim Tarihi: 5/2/2019
- TROMPETTE A, GOLLWITZER ES, YADAVA K, SICHELSTIEL AK, SPRENGER N, NGOM-BRUC, BLANCHARD C, JUNT T, NICOD L, HARRIS NL, MARSLAND BJ (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine*, **20**: 159-166.

- USP 40. " PHYSICAL TESTS / <621> CHROMATOGRAPHY ", "<711> Delayed-release dosage forms, 2017.
Erişim adresi: https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c621_1SUSP40.pdf. Son erişim tarihi: 30/03/2019.
- VAN BREEMEN RB, LI R (2005). Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **1(2)**.
- VAN DEN MOOTER G, MARIS B, SAMYN C, AUGUSTIJNS P, KINGET R (1997). Use of Azo Polymers for Colon-Specific Drug Delivery. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, **86(12)**: 1321-1327.
- VARSHOSAZ J, ALINAGARI, R. (2005). Effect of Citric Acid as Cross-linking Agent on Insulin Loaded Chitosan Microspheres. *Iranian Polymer Journal*, **14(7)**: 647-656.
- VARSHOSAZA J, EMAMIA J, TAVAKOLIA N, MINAIYANB M, RAHMANIA N, DORKOOSHC F, MAHZOUNI P (2012). Pectin Film Coated Pellets for Colon-targeted Delivery of Budesonide: In-vitro/In-vivo Evaluation in Induced Ulcerative Colitis in Rat. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **11(3)**: 733-745.
- VARUM FJ, VEIGA F, SOUSA JS, BASIT AW (2011). Mucoadhesive platforms for targeted delivery to the colon. *Int J Pharm*, **420(1)**: 11-19. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.006
- WANG B, YAO M, LV L, LING Z, LI L (2017). The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*, **3**: 71-82. doi:10.1016/J.ENG.2017.01.008
- WAYS TMM, LAU WM, KHUTORYANSKIY VV (2018). Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers*, **10(267)**. doi:10.3390/polym10030267
- WIRTH M, FUCHS A, WOLF M, ERTL B, GABOR F (1998). Lectin-mediated drug targeting: preparation, binding characteristics, and antiproliferative activity of wheat germ agglutinin conjugated doxorubicin on Caco-2 cells. *Pharm Res.*, **15(7)**: 1031-1037.
- WOOD JD, LIU S, DROSSMAN DA, RINGEL Y, WHITEHEAD WE (2012). Anti-enteric neuronal antibodies and the irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil*, **18(1)**: 78-85. doi:10.5056/jnm.2012.18.1.78
- WYNNE AM, WENDLANDT, W.W. (1975). Reactions of barium chloride dihydrate in potassium halide matrices: A differential scanning calorimetry study. *Thermochimica Acta*, **13(4)**: 403-408.
- XU M, SUN M, QIAO H, PING Q, ELAMIN ES (2014). Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid. *Int J Pharm*, **468(1-2)**: 165-171. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.04.040
- VEZMAR S. (2005). *Methotrexate-induced biochemical alterations of the folate and methyl-transfer pathway in the CNS*. Universität Bonn.

- YAMAOKA T, MAKITA Y, SASATANI H, KIM S, KIMURA Y (2000). Linear type azo-containing polyurethane as drug-coating material for colon-specific delivery: its properties, degradation behavior, and utilization for drug formulation. *Journal of Controlled Release*, **66**: 187-197.
- YANG H, HON M (2010). The Effect of the Degree of Deacetylation of Chitosan Nanoparticles and its Characterization and Encapsulation Efficiency on Drug Delivery. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **49**: 1292-1296. doi:10.1080/03602559.2010.482076
- YANG J, HAN S, ZHENG H, DONG H, LIU J (2015). Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydr Polym*, **123**: 53-66. doi:10.1016/j.carbpol.2015.01.029
- YILDIZ HM, MCKELVEY CA, MARSAC PJ, CARRIER RL (2015). Size selectivity of intestinal mucus to diffusing particulates is dependent on surface chemistry and exposure to lipids. *J Drug Target*, **23(7-8)**: 768-774. doi:10.3109/1061186X.2015.1086359
- YONCHEVA K, MERINO M, SHENOL A, DASKALOV NT, PETKOV PS, VAYSSILOV GN, GARRIDO MJ (2019). Optimization and in-vitro/in-vivo evaluation of doxorubicin-loaded chitosan-alginate nanoparticles using a melanoma mouse model. *Int J Pharm*, **556**: 1-8. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.11.070
- YU C, WANG, Y., LI, N., LIU G., YANG S., TANG G., HE D., TAN X., WEI H. (2014). In Vitro and in Vivo Evaluation of Pectin-Based Nanoparticles for Hepatocellular Carcinoma Drug Chemotherapy. *Molecular Pharmaceutics*, **11**: 638-644.
- YUAN Y, CHESNUTT BM, HAGGARD WO, BUMGARDNE JD (2011). Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures. *Materials*, **4**: 1399-1416. doi:10.3390/ma4081399
- YÜKSEL N. (2014). Kaplama Teknolojisi Doktora Ders Notları
- YÜKSEL N, BAYKARA, T., KANİK, A.E. (2000). Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. *International Journal of Pharmaceutics*, **209(1-2)**: 57-67.
- ZAPPIA V, DEROSS M (1991). LIPOPHILIC SALTS OF S-ADENOSYL-L-METHIONINE (SAM) WITH ACYLATED TAURINE DERIVATIVES. *United States Patent*.
- ZHANG J, KLINMAN, J. P. (2015). High-performance liquid chromatography separation of the (S,S)- and (R,S)-forms of S-adenosyl-L-methionine. *Anal Biochem*, **476**: 81-83. doi:10.1016/j.ab.2015.02.004
- ZHANG L, LI, Y., WANG, C., LI, G., ZHAO, Y., YANG, Y. (2014). Synthesis of methylprednisolone loaded ibuprofen modified inulin based nanoparticles and their application for drug delivery. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, **42(111-115)**.

- ZHANG Y, CHENB, T., YUANA, P., TIANC, R., HU, W., TANGA, Y., JIA, J., ZHANG, L. (2015). Encapsulation of honokiol into self-assembled pectin nanoparticles for drug delivery to HepG2 cells. *Carbohydrate Polymers*, **133**: 31-38.
- ZHUANG C, ZHONG Y, ZHAO Y (2019). Effect of deacetylation degree on properties of Chitosan films using electrostatic spraying technique. *Food Control*, **97**: 25-31. doi:10.1016/j.foodcont.2018.10.014
- ZIRH-GÜRSOY A. (2014). Nanofarmasötiklerin Dünyü, Bugünü ve Geleceği. In: *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları* Ed.: Zırh-Gürsoy, A., İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği. 1-7.



EKLER

Ek-1. Etik Raporu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 25/02/2015
TOPLANTI NO : 2015-3
DOSYA NO : 2015-48
KARAR NO : 2015-3-65

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Nilüfer Yüksel'in yaptığı ve araştırmacı olarak Dr.Ecz.Zerrin Sezgin Bayındır, Ezc.Ahmet Doğan Ergin ve Prof.Dr.Tanju Özçelikay'ın katıldığı "S-Adenozil-L-Metiyonin'in Oral Yolla Verilişte Biyoyararlanımını Artırmak İçin Formülasyon Yaklaşımları: İn Vitro ve İn Vivo Değerlendirilmeleri" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 58
Geçerlilik Süresi : 01/09/2015-01/09/2018

ASLININ AYNIĞIDIR
25/02/2015


Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Ahmet Doğan
Soyadı Ergin
Doğum yeri ve tarihi 04.05.1989/Karabük
Uyruğu T.C.
Medeni durumu Bekar
Askerlik durumu Tecilli
İletişim adresi ve telefonu Kırığı Sok. Pınar Apt No:2 Anıttepe Cad. Maltepe/Ankara

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru) **Doktora-** Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji (2013-)

Lisans- Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2007-2012)

Lise- TED Karabük Koleji (2003-2012)

İlköğretim- Safranbolu Ünsal Tülbentçi İlköğretim Okulu (1996-2003)

Yabancı dili

İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru)

Araştırma Görevlisi –Ecz. (2013-2018)

IV- Mesleki Deneyimi

Türk Eczacılar Birliği-İthal İlaç Birimi -Eczacı (Temmuz 2012-Ocak 2013)

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı- Araştırma Görevlisi (Şubat 2013-Aralık 2018)

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu- Eczacı (Ocak 2018- Devam ediyor)

Türk Farmasötik Teknologlar Derneği (TÜFTAD)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemleri, akışkan yatakta kaplama, biyopolimerler

Yayınları: (ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap ya da kitap bölümü vb.)

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. SEZGİN BAYINDIR ZERRİN, ERGİN AHMET DOĞAN, PARMAKSIZ MAHMUT, ELÇİN AYŞE ESER, ELÇİN YAŞAR MURAT, YÜKSEL NİLÜFER (2016). Evaluation Of Various Block Copolymers For Micelle Formation And Brain Drug Delivery In Vitro Characterization And Cellular Uptake Studies. Journal of Drug Delivery Science and Technology

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler :

1.ERGİN AHMET DOĞAN,SEZGİN BAYINDIR ZERRİN,YÜKSEL NİLÜFER (2018). Preparation and Characterization of SAME Loaded Inulin Nanoparticles: Comparison of Different Crosslinking Agents. International Pharmaceutical Technology Symposium- Antalya/Türkiye (Tam Metin Bildiri/Poster)

2.ERGİN AHMET DOĞAN,SEZGİN BAYINDIR ZERRİN,YÜKSEL NİLÜFER (2018). Preparation and optimization of SAME loaded Inulin based nanoparticles for colon targeting delivery. 4th International Bio-based Polymers and Composites (BiPoCo) 2018- Budapeşte/Macaristan (Tam Metin Bildiri/Poster)

3.ERGİN AHMET DOĞAN,GÜMÜŞTAŞ MEHMET,ÖZKAN SİBEL AYŞIL,ÖZÇELİKAY ARİF TANJU,YÜKSEL NİLÜFER (2018). Development And Validation Of A Selective HPLC Method For The Determination Of S-Adenosyl L-Methionine Isomers From Rat Plasma. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS)- Ankara/Türkiye (Tam Metin Bildiri/Poster)

4.YÜKSEL NİLÜFER,SEZGİN BAYINDIR ZERRİN,ERGİN AHMET DOĞAN,PARMAKSIZ MAHMUT,ELÇİN AYŞE ESER,ELÇİN YAŞAR MURAT (2017). Evaluation Of Polymeric Micelles Prepared From Various Block Copolymers for Brain Targeting : In Vitro Cellular Uptake Studies. 21st International Symposium on Microencapsulation - Faro, Portugal - September 27-29, 2017, (Özet Bildiri/Poster)

5.ERGİN AHMET DOĞAN,SEZGİN BAYINDIR ZERRİN,YÜKSEL NİLÜFER (2017). Preparation and Optimization of S-Adenosyl-L-methionine Loaded Pectin Based Nanoparticles For Colon Targeted Delivery. XXnd International Biomedical Science Technology Symposium (BIOMED 2017) (Özet Bildiri/Poster)- Ankara/Türkiye

6.SEZGİN BAYINDIR ZERRİN,ERGİN AHMET DOĞAN,PARMAKSIZ MAHMUT,ELÇİN AYŞE ESER,ELÇİN YAŞAR MURAT,YÜKSEL NİLÜFER (2015). Cytotoxicity Of Various Micelle Forming

Copolymers On Brain Cell Line. EUFEPS Annual Meeting, 2015 – Geneva/İsviçre

7.GÜN ÖZGE,ERGİN AHMET DOĞAN,GÖRGÖZ MİRAY,ARISOY SEMA,GİZEM RÜYA ÇAMCA (2015). Comparative Evaluation Of Granulac Starch Granules Produced By Wet Granulation Method Using PVP Binder In A Low Shear Mixer Granulator. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium-Ankara/ Türkiye

8.SEZGİN BAYINDIR ZERRİN,ERGİN AHMET DOĞAN,YÜKSEL NİLÜFER (2015). Effects Of Different Preparation Methods On Polymeric Micelle Formation. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), 2015 – Ankara/Türkiye

9.ERGİN AHMET DOĞAN (2014). Estimation of Critical Micelle Concentration for Different Derivates of Polyethylene Glycol Polylactic Acid PEG PLA and Polystyrene Polyacrylic Acid PS PAA Copolymers. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium – Antalya/Türkiye

10.ERGİN AHMET DOĞAN, EREN TUGBA, TURHAN FATİH, CEYDA TUBA SENDEL TURK,HASCICEK CANAN (2013). Comparative Study of Losartan Potassium Release From Matrix Tablets with Kollidon SR or Ethylcellulose. 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery Pisa, Italy

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar
Ödüller

Projeleri

Verdiği konferans ya da seminerler

-

Mansiyon Ödülü "Diyabetik Ayak İçin Geliştirilen Propolis Emdirilmiş Tabanlık", DÜZCE ÜNİVERSİTESİ-Arıcılık Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezi-Arıcılık ve Arı Ürünleri AR-GE Proje Pazarı-Apiterapi, 2014

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Hamilelikte Emniyetli İlaç Kullanımının Sağlanmasına Yönelik Olarak İlaç Taşıyıcı Sistemlerin İncelenmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, , 15/04/2013 - 05/01/2016

2. S Adenozil L Metiyonin in Oral Yolla Verilişte Biyoyararlanımını Artırmak İçin Formülasyon Yaklaşımları İn Vitro ve İn Vivo Değerlendirmeleri, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, , 01/10/2015-2018

-Pediyatrik Dozaj Formlarının Tasarımı ve Geliştirilmesi (2013-14/Bahar)

-Kolona Spesifik Partiküler İlaç Şekilleri:
Hazırlanmaları ve Uygulamaları (2014-15/Güz)
-Akışkan Yatak Sisteminde Kaplama Teknolojisi
Nanopartiküler Sistemlerde Kullanımı (2015-16/Bahar)

Katıldığı paneller (panelist olarak)

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı
kurslar ve

Katıldığı eğitim seminerleri

1. Etkili Sunum Teknikleri (Türk Eğitim Derneği
Sürekli Eğitim Merkezi, Kurs, 15.04.2018 -15.04.2018)

2. Modern Moleküler Klonlama Eğitimi
(Advanced Molecular Cloning Techniques) (Bilkent
Üniversitesi, Institute of Materials Science and
Nanotechnology – National Nanotechnology Research
Center (UNAM), Kurs, 26.01.2018 -28.01.2018)

3. Shimadzu'dan İleri Analitik Teknolojiler ve
Kolon Semineri (Ankara Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi, Kurs, 19.10.2017 -19.10.2017)

4. 2nd Symposium Workshop of NEU
Compaction Simulator Center: Solid Dosage
Formulation Process Development: “QbD/PAT in
Mind.” (Yakın Doğu Üniversitesi)

Organizasyonunda katkıda
bulunduğu bilimsel toplantılar
Diğer üyelikleri

Sağlık Ekonomisi ve Politikası Derneği
Türk Eğitim Derneği
Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacılar Derneği