

**PARENTERAL VERİLİŞE UYGUN  
LİTYUM İÇEREN *İN SİTU* JELLEŞEN  
SİSTEM HAZIRLANMASI ve  
*İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Sinan ÖZER**

**Eskişehir 2018**

**PARENTERAL VERİLİŞE UYGUN LİTYUM İÇEREN *İN SİTU* JELLEŞEN  
SİSTEM HAZIRLANMASI ve *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Sinan ÖZER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Emine Yasemin YAZAN**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**


**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Mayıs 2018**

*Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1707S447 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sinan ÖZER'in "Parenteral Veriliş Uygun Lityum İçeren *İn Situ* Jelleşen Sistem Hazırlanması ve *İn Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 11/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof.Dr. Yasemin YAZAN	
Üye	: Prof.Dr. Sevda ŞENEL	
Üye	: Dr.Öğr. Üyesi Evrim YENİLMEZ	

Prof.Dr.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### PARENTERAL VERİLİŞE UYGUN LİTYUM İÇEREN *İN SİTU* JELLEŞEN SİSTEM HAZIRLANMASI ve *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Sinan ÖZER

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2018

Danışman: Prof. Dr. Emine Yasemin YAZAN

İnsanlık tarihinin başlangıcından bu yana bireylerin genetik ve/veya çevresel nedenlerden dolayı düşünce ve davranış bozuklukları yaşadıkları psikolojik hastalıklar bilinen bir gerçektir. Bipolar bozukluk olarak sınıflandırılan, bireyin depresif ve manik ataklar ile seyreden klinik tablo içerisinde bulunduğu duygudurum bozukluğu da bu hastalıklar arasında yer almaktadır.

Lityum, geçtiğimiz yüzyılın ortalarından beri bipolar bozukluk tedavisinde kullanılan ilk sıra ve en etkili etkin maddedir. Ancak dar terapötik aralığı ve yan etki profili lityum'un dikkatli ve kontrollü kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Piyasada bulunan lityum preparatlarının kullanımında hasta uyuncuna yüksek oranda gereksinim duyulmaktadır. Ancak bipolar bozukluğa sahip olan bireylerin psikolojik durumları göz önünde bulundurulduğunda hasta uyuncunu beklemenin hasta tedavisi açısından doğru bir yaklaşım olmadığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında hasta uyuncuna duyulan gereksinimi minimuma indirecek ve lityum'un kan derişiminin terapötik aralıkta tutulmasını sağlayacak şekilde salım yapma özelliğine sahip *in situ* jelleşen sistem hazırlanması amaçlanmıştır.

Hazırlanan *in situ* jelleşen sistemlerin oda sıcaklığı ve vücut sıcaklığındaki fizikokimyasal özelliği değerlendirilmiş ve kararlılık çalışması ICH standartlarına uygun olarak yapılmıştır. Piyasa preparatına oranla sistemin lityum'u çok daha uzun sürede saldığı ve hedeflenen özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Bipolar bozukluk, Lityum, *İN situ* jelleşen sistem, Kontrollü salım

## ABSTRACT

### PREPARATION and *IN VITRO* EVALUATION of *IN SITU* GELLING SYSTEM CONTAINING LITHIUM for PARENTERAL ADMINISTRATION

Sinan ÖZER

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, May 2018

Supervisor: Prof. Dr. Emine Yasemin YAZAN

Psychological diseases which comprise conception and behavior disorders due to genetic and/or environmental reasons are well known since the beginning of humankind. Among the psychological diseases, affective disorder classified as bipolar disorder appear with clinical symptoms of depressive and manic attacks.

Lithium is the principal and most effective drug in the treatment of bipolar disorder since the middle of the previous century. However, narrow therapeutic range and side effect profile of lithium necessitate its careful and controlled use. Patient compliance is highly needed for commercially available lithium product administration. Taking the psychological status of patients with bipolar disorder into account, patient compliance seems to be an inappropriate approach for treatment. *In situ* gelling system which can minimize the need of patient compliance and owns the property of keeping lithium release in the therapeutic range was aimed to be prepared in this thesis.

For the *in situ* gelling systems prepared, physicochemical characteristics both at room and body temperatures were evaluated and stability studies were achieved according to ICH standards. The system prepared was determined to demonstrate prolonged release and to show the desired characteristics when compared to the commercially available preparation.

**Keywords:** Bipolar disorder, Lithium, *In situ* gelling system, Controlled release

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yürüttüğüm bu süreç boyunca ihtiyacım olan her türlü desteği sunan, her konuda ilkeli ve anlayışlı davranan, değerli bilgilerini ve yardımını esirgemeyen aynı zamanda beni çalışmalarım boyunca cesaretlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yasemin YAZAN'a,

Çalışmalarım sırasında deneyimlerine ve bilgilerine sıkça başvurduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Müzeyyen Demirel'e, Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Doç. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Evrim YENİLMEZ'e, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a ve Dr. Ecz. Alper ÖZTÜRK'e,

Sitotoksosite çalışmalarında bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen hocam Araş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL'e,

Tez çalışmalarım dışında birlikte yürüttüğümüz proje ve çalışmalarda bana laboratuvar disiplini ve çalışmalarım süresince kullandığım cihazları öğreten Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDaş KIRIMLIOĞLU'na,

FT-IR analizlerinde bana yardımcı olan Serkan LEVENT'e,

SEM ile yaptığım çalışmalarında yol gösteren Şennur GÖRGÜLÜ'ye,

İki yıllık yüksek lisans hayatım boyunca birlikte zaman geçirdiğim ve benden yardımlarını esirgemeyen değerli yüksek lisans arkadaşlarıma,

Bu süreçte desteğini ve yardımını her zaman hissettiğim Gizem DEĞER'e,

Birbirimizden uzakta yaşasak da her zaman yanımda olduklarını hissettiğim, maddi ve manevi her konuda bana destek olan, güvenen ve arkamda duran, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem, babam ve kardeşime,

## TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

11/05/2018

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Sinan ÖZER

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI .....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ .....	3
2.1. Bipolar Bozukluk (Manik-Depresif Hastalık) .....	3
2.1.1. Tanı ve Tedavi .....	3
2.2. Lityum .....	4
2.3. İlaç Uygulama Yolları .....	8
2.3.1. Epidermal uygulama .....	8
2.3.2. Konjonktiva üzerine uygulama .....	8
2.3.3. İntranazal uygulama .....	8
2.3.4. Dış kulak yoluna uygulama .....	8
2.3.5. Bukkal (ağız-içi) uygulama .....	9
2.3.6. İntratekal uygulama .....	9
2.3.7. İntravajinal uygulama .....	9
2.3.8. İntrapevral ve intraperitoneal uygulama .....	9
2.3.9. İntrakardiyak enjeksiyon .....	9
2.3.10. İntrauterin enjeksiyon .....	9
2.3.11. İntraartiküler enjeksiyon .....	10
2.3.12. Rektum içine ve kolon içine uygulama .....	10
2.3.13. Lezyon içine uygulama .....	10
2.3.14. Oral ilaç uygulama yolları .....	10
2.3.15. Cilt içine (intradermal) enjeksiyon .....	10

2.3.16. Deri altına enjeksiyon (s.c.- subcutan) .....	11
2.3.17. Kas içine enjeksiyon (i.m.- intramuscular) .....	12
2.3.18. Damar içine enjeksiyon (i.v.- intravenöz) .....	13
2.3.19. Transdermal ilaç uygulama .....	14
2.3.20. İnhalasyonla ilaç uygulama .....	15
2.4. Parenteral Preparat .....	15
2.5. Değiştirilmiş Salımlı Dozaj Şekilleri .....	16
2.5.1. Uzatılmış salımlı dozaj şekilleri .....	16
2.5.2. Geciktirilmiş salımlı dozaj şekilleri .....	16
2.5.3. Multifazik salımlı dozaj şekilleri .....	17
2.5.3.1. <i>Bifazik salım</i> .....	17
2.5.3.2. <i>Peşpeşe salım</i> .....	17
2.5.4. Çok dozlu .....	17
2.5.5. Tek dozlu .....	17
2.5.6. İnamüsküler/subkütan depo formülasyonları .....	17
2.5.7. Transdermal ilaç taşıyıcı sistemler .....	17
2.6. Kontrollü salım sistemi .....	18
2.7. <i>In situ</i> Jelleşen Sistem .....	19
2.7.1. Sıcaklığa duyarlı <i>in situ</i> jelleşen sistem .....	20
2.7.2. pH'ya duyarlı <i>in situ</i> jelleşen sistem .....	20
2.7.3. İyonik çapraz bağlanma ile oluşan <i>in situ</i> jelleşen sistem .....	20
3. GEREÇLER .....	22
3.1. Kullanılan Maddeler .....	22
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	22
4. YÖNTEM .....	24
4.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışması .....	24
4.1.1. Analitik yöntem geliştirme .....	24
4.1.2. Validasyon .....	24
4.1.2.1. <i>Doğrusallık</i> .....	25
4.1.2.2. <i>Doğruluk</i> .....	25
4.1.2.3. <i>Kesinlik</i> .....	26
4.1.2.4. <i>Çalışma aralığı</i> .....	26
4.1.2.5. <i>Duyarlılık</i> .....	26





5.2.4.2. <i>Jelleşme sıcaklığı</i> .....	54
5.2.4.2.1. <i>30. Gün</i> .....	54
<i>4°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	54
<i>25°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	55
<i>40°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	55
5.2.4.2.2. <i>60. Gün</i> .....	55
<i>4°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	55
<i>25°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	56
<i>40°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	56
5.2.4.2.3. <i>90. Gün</i> .....	56
<i>4°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	56
<i>25°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	57
<i>40°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	57
5.2.4.3. <i>Jelleşme kapasitesi</i> .....	57
5.2.4.3.1. <i>90. Gün</i> .....	57
<i>4°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	57
<i>25°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	58
<i>40°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	58
5.2.4.4. <i>Şişme</i> .....	58
5.2.4.4.1. <i>90. Gün</i> .....	58
<i>4°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	58
<i>25°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	59
<i>40°C’de saklanan formülasyonlar</i> .....	59
5.2.4.5. <i>pH ölçümü</i> .....	60
5.2.4.5.1. <i>30. Gün</i> .....	60
5.2.4.5.2. <i>60. Gün</i> .....	60
5.2.4.5.3. <i>90. Gün</i> .....	61
5.2.4.6. <i>Reolojik davranış</i> .....	61
5.2.4.6.1. <i>4°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların</i> <i>reolojik davranışı</i> .....	61
5.2.4.6.2. <i>25°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların</i> <i>reolojik davranışı</i> .....	65

5.2.4.6.3. 40°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların reolojik davranışı .....	69
5.2.4.7. Infrared (FTIR) profili .....	73
5.2.4.8. Etkin madde miktar tayini .....	75
5.2.4.9. Birleştirilmiş kararlılık sonuçları .....	76
5.2.5. Sitotoksisite .....	77
6. TARTIŞMA .....	79
6.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışması .....	79
6.2. İn situ Jel Formülasyon Çalışması .....	80
6.3. Salm .....	84
6.4. Kararlılık .....	85
6.5. Sitotoksisite .....	86
7. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	90
KAYNAKÇA .....	92
ÖZGEÇMİŞ	

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 4.1.</b> Alevli atomik absorpsiyon spektrometresi çalışma koşulları .....	24
<b>Tablo 4.2.</b> Etkin maddesiz formülasyon oranları (% a/a) .....	28
<b>Tablo 4.3.</b> Jelleşme kapasitesi belirteçleri .....	30
<b>Tablo 5.1.</b> Serilerin derişim ve absorbands değeri .....	36
<b>Tablo 5.2.</b> Serilerin regresyon eşitliğine ait eğim, kesişim ve determinasyon katsayısı .....	37
<b>Tablo 5.3.</b> Serilerin derişim ve absorbands değeri .....	38
<b>Tablo 5.4.</b> Serilerin regresyon eşitliğine ait eğim, kesişim ve determinasyon katsayısı .....	38
<b>Tablo 5.5.</b> Doğruluk çalışması sonucu .....	39
<b>Tablo 5.6.</b> Doğruluk çalışması sonucu .....	39
<b>Tablo 5.7.</b> Kesinlik çalışması sonucu .....	40
<b>Tablo 5.8.</b> Kesinlik çalışması sonucu .....	41
<b>Tablo 5.9.</b> Çalışma aralığı sonucu (saf su) .....	42
<b>Tablo 5.10.</b> Çalışma aralığı sonucu (fosfat tamponu) .....	43
<b>Tablo 5.11.</b> Duyarlılık çalışması bulgusu (saf su) .....	44
<b>Tablo 5.12.</b> Duyarlılık çalışması bulgusu (fosfat tamponu) .....	44
<b>Tablo 5.13.</b> Etkin maddesiz formülasyonların jelleşme sıcaklığı .....	45
<b>Tablo 5.14.</b> Etkin maddesiz formülasyonların pH değeri .....	45
<b>Tablo 5.15.</b> Etkin maddeli formülasyon çözeltisinin polimer ve koruyucu madde derişimi (% a/a) .....	46
<b>Tablo 5.16.</b> Etkin maddeli formülasyonların jelleşme sıcaklığı .....	47
<b>Tablo 5.17.</b> Formülasyonlarda etkin madde, polimer ve koruyucu madde	

değişimi (% a/a) .....	48
<b>Tablo 5.18.</b> <i>In situ</i> jel formülasyonlarının jelleşme kapasitesi .....	48
<b>Tablo 5.19.</b> <i>In situ</i> jel formülasyonlarının şişme oranı .....	48
<b>Tablo 5.20.</b> Formülasyonların sıcaklığa bağlı pH değeri .....	49
<b>Tablo 5.21.</b> Etkin maddenin parçacık boyutu .....	51
<b>Tablo 5.22.</b> Zamana karşı kümülatif çözünen etkin madde miktarı .....	53
<b>Tablo 5.23.</b> <i>In vitro</i> salım çalışmasının matematiksel modellemelere uyumu .....	54
<b>Tablo 5.24.</b> Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (4°C) .....	55
<b>Tablo 5.25.</b> Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (25°C) .....	55
<b>Tablo 5.26.</b> Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (40°C) .....	55
<b>Tablo 5.27.</b> Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (4°C) .....	56
<b>Tablo 5.28.</b> Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (25°C) .....	56
<b>Tablo 5.29.</b> Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (40°C) .....	56
<b>Tablo 5.30.</b> Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (4°C) .....	57
<b>Tablo 5.31.</b> Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (25°C) .....	57
<b>Tablo 5.32.</b> Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (40°C) .....	57
<b>Tablo 5.33.</b> Formülasyonların jelleşme kapasitesi .....	58

<b>Tablo 5.34.</b> Formülasyonların jelleşme kapasitesi .....	58
<b>Tablo 5.35.</b> Formülasyonların jelleşme kapasitesi .....	58
<b>Tablo 5.36.</b> <i>In situ</i> jel formülasyonlarının şişme oranı .....	59
<b>Tablo 5.37.</b> <i>In situ</i> jel formülasyonlarının şişme oranı .....	59
<b>Tablo 5.38.</b> <i>In situ</i> jel formülasyonlarının şişme oranı .....	60
<b>Tablo 5.39.</b> Formülasyonların sıcaklığa bağlı pH değeri .....	60
<b>Tablo 5.40.</b> Formülasyonların sıcaklığa bağlı pH değeri .....	61
<b>Tablo 5.41.</b> Formülasyonların sıcaklığa bağlı pH değeri .....	61
<b>Tablo 5.42.</b> EP15.5 formülasyonunda etkin madde miktarı (% geri kazanım) .....	76
<b>Tablo 5.43.</b> EPF16.5 formülasyonunda etkin madde miktarı (% geri kazanım) .....	76
<b>Tablo 5.44.</b> Kararlılık çalışmasının sonuçları .....	77
<b>Tablo 5.45.</b> Etkin madde ve formülasyonlara ait IC <sub>50</sub> değeri .....	78

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Lityum karbonat'ın kimyasal formülü .....	5
Şekil 2.2. Derinin yapısı ve fonksiyonları .....	11
Şekil 2.3. Subkütan enjeksiyon bölgeleri .....	12
Şekil 2.4. Kas içi enjeksiyonda genellikle kullanılan kas bölgeleri .....	13
Şekil 2.5. Transdermal Sistem .....	14
Şekil 2.6. Kontrollü salım sisteminden salınan etkin maddenin kan derişim - zaman grafiği .....	18
Şekil 5.1. Serilerin regresyon eğrisi .....	37
Şekil 5.2. Serilerin regresyon eğrisi .....	38
Şekil 5.3. Çalışma aralığına ait derişim eğrisi .....	42
Şekil 5.4. Çalışma aralığına ait derişim eğrisi .....	43
Şekil 5.5. Formülasyonlara ait reogram .....	50
Şekil 5.6. Lityum karbonat ve formülasyonların FT-IR spektrumu .....	51
Şekil 5.7. Lityum karbonat örneğinin 3 farklı bölgesinden alınan SEM görüntüleri .....	52
Şekil 5.8. <i>In vitro</i> salım profili .....	53
Şekil 5.9. 4°C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 25°C'deki reogramı .....	62
Şekil 5.10. 4°C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 37°C'deki reogramı .....	63
Şekil 5.11. 4°C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 25°C'deki reogramı .....	64
Şekil 5.12. 4°C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 37°C'deki reogramı .....	65

<b>Şekil 5.13.</b> 25°C’de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 25°C’deki reogramı .....	66
<b>Şekil 5.14.</b> 25°C’de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 37°C’deki reogramı .....	67
<b>Şekil 5.15.</b> 25°C’de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 25°C’deki reogramı .....	68
<b>Şekil 5.16.</b> 25°C’de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 37°C’deki reogramı .....	69
<b>Şekil 5.17.</b> 40°C’de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 25°C’deki reogramı .....	70
<b>Şekil 5.18.</b> 40°C’de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 37°C’deki reogramı .....	71
<b>Şekil 5.19.</b> 40°C’de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 25°C’deki reogramı .....	72
<b>Şekil 5.20.</b> 40°C’de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 37°C’deki reogramı .....	73
<b>Şekil 5.21.</b> EP15.5 formülasyonunun 90. gündeki FT-IR spektrumu .....	74
<b>Şekil 5.22.</b> EPF16.5 formülasyonunun 90. gündeki FT-IR spektrumu .....	75
<b>Şekil 5.23.</b> 24 saat sonunda formülasyonların gösterdiği % hücre canlılığı .....	77
<b>Şekil 5.24.</b> 48 saat sonunda formülasyonların gösterdiği % hücre canlılığı .....	78

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b><math>\mu\text{m}</math></b>	: Mikrometre
<b>a/a</b>	: Kütle/Kütle
<b>AAAS</b>	: Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi
<b>AIC</b>	: Akaike Bilgi Kriteri
<b>AUC<sub>0-t</sub></b>	: Eğrinin altında kalan
<b>C<sub>av</sub></b>	: Ortalama kan derişimi
<b>C<sub>max</sub></b>	: Maksimum kan derişimi
<b>C<sub>min</sub></b>	: Minimum kan derişimi
<b>D/cm<sup>2</sup></b>	: Dyne/santimetre <sup>2</sup>
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DSM-IV</b>	: Mental Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal El Kitabı
<b>EKG</b>	: Elektrokardiyografi
<b>EMA</b>	: Avrupa İlaç Kurumu
<b>EP</b>	: Avrupa Farmakopesi
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>FSH</b>	: Folükül Uyarıcı Hormon
<b>GİS</b>	: Gastrointestinal sistem
<b>IC<sub>50</sub></b>	: %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon
<b>ICH</b>	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
<b>ICH</b>	: Uluslararası Harmonizasyon Konseyi
<b>i.m.</b>	: İntramüsküler
<b>i.v.</b>	: İntravenöz
<b>LH</b>	: Lüteinleştirici Hormon

<b>Li<sub>2</sub>CO<sub>2</sub></b>	: Lityum Karbonat
<b>LoD</b>	: Saptama Sınırı
<b>LoQ</b>	: Miktar Tayini Sınırı
<b>MEK</b>	: Minimum etkin derişim
<b>MTK</b>	: Minimum toksik derişim
<b><i>n</i></b>	: Örnekleme boyutu
<b>ORT</b>	: Ortalama
<b>PAA</b>	: Poliakrilik asit
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon tuzu
<b>ppm</b>	: Milyonda bir parça (parts per million)
<b><i>r</i></b>	: Korelasyon katsayısı
<b><i>r</i><sup>2</sup></b>	: Determinasyon katsayısı
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>RPMI</b>	: Roswell Park Memorial Institute
<b><i>s.c.</i></b>	: Subkütan
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>SH</b>	: Standart Hata
<b>TEM</b>	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
<b>TSH</b>	: Tiroid Uyarıcı Hormon
<b>ym</b>	: Yeterli miktar

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bireyin psikolojik durumunda veya daha geleneksel söylemlerle ruhsal durumunda ortaya çıkarak düşünce ve davranış bozukluğuna neden olan farklı değişimlerin varlığı insanlık tarihinden bu yana bilinen bir gerçektir. Günümüzde ruhsal durum değişimleri sınıflandırılmış ve patolojik durumlar olarak literatüre geçmiştir. Manik depresif hastalık olarak da bilinen bipolar bozukluk bahsedilen hastalıklardan birisidir. Bipolar bozukluğu olan kişi maniden şiddetli depresyona kadar uzanan değişim geçirir. Bu durum sanrıya neden olacak düzeye ulaşabilmektedir.

Lityum, bipolar bozukluk tedavisinde kullanılan ilaçların başında gelmektedir. Lityum ile tedavi edilen bipolar bozukluğa sahip hastaların %70-80'inde belirtilerin iyileştiği görülmüştür. Ancak lityum'un sahip olduğu dar terapötik indis, lityum ile tedavide toksik etkilerin görülme riskini de oldukça arttırmaktadır. Lityum tedavisi gören hastaların duygudurum bozukluğu göz önüne alındığında hasta uyuncu gerektiren tedavinin toksisite açısından oldukça riskli olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak hastalığın tedavisinde lityum kan düzeyinin tedavi süresince terapötik aralıkta tutulması da tedavinin başarısı için oldukça kritik bir parametredir.

Bu projenin amacı etkin madde kan derişimini terapötik pencerede tutarak toksik düzeye ulaşmasını veya etkisiz düzeye düşmesini engelleyecek ve hasta uyuncuna duyulan gereksinimi en düşük düzeye çekecek kontrollü salım sağlayan yeni bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmektir. Günümüze dek birçok etkin madde için bahsedilen amaçlara uygun şekilde kontrollü salım sağlayan ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmış ve bazı sistemler başarıyla hastalara uygulanmaya başlanmıştır.

Hedeflendiği bölgede visköz duruma geçen *in situ* jelleşen sistem kontrollü salım sistemleri başlığı altındaki başarılı ilaç taşıyıcılardan birisidir. Bu sistemde sıcaklık, pH, ışık, elektromanyetik radyasyon ve biyomolekül gibi uyaranlara yanıt veren ve basit geri dönüşümlü faz değişimine uğrayan (çözelti-jel) hidrojel kullanılmaktadır. Bu tip hidrojel akışkan sıvı halinde arzu edilen doku, organ veya vücut boşluğu içerisine gönderilebilir ve hedeflenen bölgede jelleşerek planlanan ilaç salımını gerçekleştirebilir.

Bu yüksek lisans tezi kapsamında *in situ* jelleşen sisteme lityum yüklenmesi ve ardından hazırlanan formülasyonların karakterizasyonu, kararlılık ve *in vitro* salım

özelliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Formülasyonu yapılan sistem ile lityum tedavisi gören hastalarda ortaya çıkabilecek sorunlara çözüm bulunmasında ilk basamak çalışmanın gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

## **2. KAYNAK BİLGİSİ**

### **2.1. Bipolar Bozukluk (Manik-Depresif Hastalık)**

Bipolar bozukluk veya eski tanımıyla manik depresif hastalık, yaygın, tekrarlayan ve şiddetli bir psikiyatrik hastalıktır. Nörobiyolojik temeli olan hastalıkla ilgili birçok çalışma yapılmasına karşın patofizyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Duygudurum bozuklukları arasında sınıflandırılan bu hastalıkta hasta manik ve depresif durum arasında değişiklik gösteren dalgalanma yaşar. Aynı zamanda bilinç ve davranışlar da etkilenecek sıklıkla psikotik belirtiler (örneğin, sanrı, karışık düşünce) ortaya çıkar (Keck Jr, McElroy ve Arnold, 2001; Vahip, 2004; Altıntaş, Oral ve Vahip, 2005; Kara, Akarsu ve Verim, 2013).

Amerikan Psikiyatri Derneği tarafından yayımlanan DSM-IV'de aynı bireyde mani ve depresyonun birlikte bulunması bipolar I bozukluk, hipomani ve depresyonun birlikteliği de bipolar II bozukluk olarak tanımlanmaktadır (Vahip, 2004).

Gerçekleştirilen genetik çalışmalarda tek yumurta ikizlerinde hastalığın iki bireyde de görülme yüzdesinin %85'e kadar yükseldiği belirlenmiştir. Bu durum bipolar bozukluğun önemli ölçüde kalıtsal olduğunu kanıtlamaktadır (Altıntaş, Oral ve Vahip, 2005).

Bipolar bozukluk hastalığı ölümcül olabilir. Hastaların en az %25'inin intihar girişiminde bulunduğu ve karışık duyguduruma sahip (manik ve depresif dönem) hastaların intiharı düşünmek açısından daha yüksek risk oluşturduğu saptanmıştır (Keck Jr, McElroy ve Arnold, 2001).

#### **2.1.1. Tanı ve tedavi**

Hirschfeld, Lewis ve Vornik (2003) tarafından yayımlanan anket çalışmasının sonucunda bipolar bozukluk hastalarının belirtilerin başlangıcından bir yıl sonra profesyonel yardım istediği ve bu hastalardan ~%70'ine yanlış tanı konulduğu bildirilmiştir. Yanlış tanı konulan hastaların doğru tanı konulmadan önce ortalama dört hekimle görüştüğü ve doğru tanı süresinin on seneye kadar uzayabildiği anlaşılmıştır. Manik ve hipomanik dönemde hastanın kendisini iyi hissetmesi manik semptomların hekimden istemsizce gizlenmesine neden olmaktadır. Bu durum tanı gecikmesinin nedeni olarak gösterilmiştir.

Bipolar bozukluk tedavisinde kullanılan duygudurumu dengeleyici ilaç, klasik antidepresan ilaçların aksine antidepresan etkinliğin yanısıra döngüler arasındaki sürenin kısalmasına ve hastanın manik döneme girmesine yol açmamaktadır. Akut bipolar bozukluk tedavisi için çalışmalar duygudurum dengeleyici etkin madde olarak en fazla lityum üzerine odaklanmıştır (Altıntaş, Oral ve Vahip, 2005). Ancak son dönemlerde lityum'un maniyi önlemede etkili olmasına karşın depresyonu önleme konusunda yetersiz kaldığını gösteren yayınlar bulunmaktadır (Eroğlu ve Özpoçraz, 2010). Lityum ile yapılan iki çalışmada hastaların geçirdiği iki manik atak arasında geçen süre değerlendirilmiştir (Eroğlu ve Özpoçraz, 2010). Lityum'un plasebo ile karşılaştırıldığı ilk çalışmada hastalar bir yıl boyunca izlenmiş ve lityum'un iki mani atağı arasındaki süreyi %55 oranında uzattığı görülmüştür. Yapılan ikinci çalışmada ise izlem süresi 18 ay olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda ise iki mani atağı arasındaki süre lityum kullananlarda %41, plasebo grubunda %17 uzamıştır. Gerçekleştirilen her iki araştırmada da lityum'un depresyona giriş süresinde anlamlı değişim yaratmadığı ve buna ek olarak ilk çalışmada depresyonun eşikaltı belirtilerini kötüleştirdiği bildirilmiştir (Eroğlu ve Özpoçraz, 2010).

Lityum ile plasebo ilacın karşılaştırıldığı bir başka çalışmada lityum tedavisi sırasında kan derişimi 0,80 mmol/L düzeyinin altında olan hastalarda tedaviye trisiklik ya da SSRI antidepresan eklenmesi anlamlı yarar sağlamamıştır (Keck, Nelson ve McElroy, 2003). Ancak serum derişimi 0,80 mmol/L'nin üstünde olan hastalarda SSRI olan paroksetin eklenmesinin plaseboya oranla daha üstün antidepresan etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

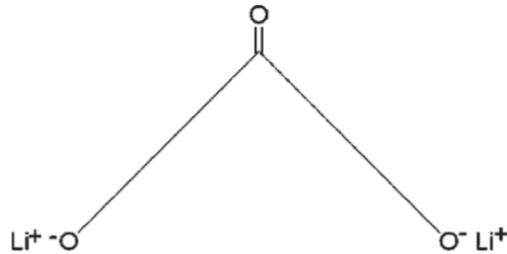
## 2.2. Lityum

Lityum bipolar bozukluğun (manik depresif hastalık) tedavisinde kullanılan ilk sıradaki ve en etkili etkin maddedir. Birden fazla sinyal yolağı kullanması ve farklı hücrel proseslere etki etmesine rağmen psikiyatride en spesifik klinik etkilere sahip olan etkin maddedir. Lityum, hücrel düzeyde sodyum (Na<sup>+</sup>), potasyum (K<sup>+</sup>), kalsiyum (Ca<sup>+2</sup>) ve Magnezyum (Mg<sup>+2</sup>) iyonlarıyla yarışır. Santral sinir sistemindeki antimanik ve antidepresan etkisinin aydınlatılan mekanizmalardan hangisi ile sağlandığı bilinmemesine rağmen, bulgular lityum'un çeşitli mekanizmalar ile (triptofan *uptake*'i, serotonin sentez ve salımının arttırılması vb.) serotonin transmisyonunu arttırdığı ve

glutamat gibi nörotransmitterlerin salım ve *reuptake*'i ile etkileştiğini göstermektedir (Alda, 2015).

Lityum klinik tedavide karbonat, klorür ve sitrat tuzu şeklinde kullanılır. Dünyada lityum tuzu içeren tablet ve kapsül, kontrollü salım sağlayan tablet ve oral ve enjeksiyonluk çözelti bulunmaktadır. Ülkemizde ise lityum tedavisi için piyasada yalnızca lityum karbonat içeren kapsül bulunmaktadır. Klinikte en sık kullanılan lityum tuzlarının sudaki çözünürlüğü değişkendir. Lityum karbonat suda eser miktarda çözünür ve çözünürlüğü sıcaklıkla ters orantılıdır. Oda sıcaklığındaki (25 °C) çözünürlüğü % 1,27 (a/a) iken 40 °C'de % 1,16'dır (a/a) (http-2, http-3). Lityum klorür'ün sudaki çözünürlüğü sıcaklıkla doğru orantılıdır ve oda sıcaklığında %84,5 (a/a) çözünürlüğe sahiptir. Serbestçe çözünür olmasına karşın sahip olduğu yüksek higroskopik özellik nedeniyle tablet formülasyonunda kullanımı uygun değildir (Schou vd., 1954; http-4). Lityum sitrat'ın oda sıcaklığında sudaki çözünürlüğü %74,5 (a/a) olarak belirlenmiştir (http-5).

Manik psikozların lityum tuzları ile tedavisi, 1949 yılında Cade tarafından, Gine domuzlarına uygulanan lityum tuzlarının sedatif benzeri etkinliğinin farkedilmesi ile başlamıştır. Ardından Ashburner (1950), Noack ve Trautner (1951) yaptıkları araştırmalarda lityum tuzlarının mani vakalarında yararlı etkilerini ortaya koymuştur (Schou vd., 1954). Lityum karbonat'ın kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir (http-2).



Şekil 2.1. Lityum karbonat'ın kimyasal formülü

Lityum, hastaların %70-80'inde manik ve depresif belirtilerin iyileştirilmesinde ve bu hastalardaki intihara yönelimin engellenmesinde başarılıdır. Ayrıca alkolizm,

şizoaffektif bozukluk ve küme baş ağrısı tedavisinde de kullanılmaktadır. Bu nedenle, lityum modern psikiyatrik tedavinin vazgeçilmez farmasötik bileşenidir. Ancak 0,6 mEq/L ile 1,5 mEq/L aralığında dar terapötik indise sahip olmasından dolayı lityum ile tedavi olan hastaların serum derişimi, endokrin ve renal fonksiyonları sık sık kontrol edilmelidir (Timmer ve Sands, 1999; McKnight vd., 2012).

Tondo, Hennen ve Baldessarini (2001) majör duygudurum bozukluğu için uzun dönem lityum tedavisi gören hastalarda intihar riskinin lityum tedavisi görmeyenlere göre %85 oranında azaldığını belirlemiştir.

Müller-Oerlinghausen vd. (1992) Aarhus, Berlin, Hamilton ve Viyana'daki klinik araştırma merkezlerinde, 6 aydan uzun süre lityum tedavisi gören 827 manik depresif ve şizoafektif hasta için mortalite verilerini toplayarak bu hastaların mortalitesini genel popülasyonun mortalitesiyle karşılaştırmıştır. Manik depresif hastaların mortalitesi genel popülasyondan 2-3 kat daha fazla olmasına karşın uzun süreli lityum tedavisi gören manik depresif ve şizoaffektif hastaların mortalitesinin genel popülasyondan anlamlı bir fark göstermediği gözlenmiştir.

McKnight vd. (2012) tarafından yayımlanan derlemede elektronik veri tabanı, uzman dergi, referans listesi, ders kitabı ve konferans özetleri taranmış ve lityumun renal fonksiyona, tiroid/paratiroid fonksiyona, kilo değişikliğine, cilt hastalığına, saç döküntüsüne ve teratojenisiteye olan etkileri raporlanmıştır. Yapılan araştırmada lityum preparatlarının böbrek yetmezliği riskini arttırabileceği ancak mutlak riskin düşük olduğu bildirilmiştir (3369 hastanın 18'inde; %0,5). Klinik hipotiroidi prevalansının lityum alan hastalarda plasebo verilere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca lityum tedavisi gören hastaların kan plazmasında Tiroid Uyarıcı Hormon (TSH), kalsiyum ve paratiroid hormonunun da arttığı belirlenmiştir. Vücut ağırlığının plasebo alanlara göre daha fazla arttığı gözlenirse de olanzepin ile tedavi edilen hastalara göre vücut ağırlıklarında anlamlı değişim saptanmamıştır. Bunun yanısıra, konjenital malformasyon, alopesi veya cilt bozukluğu riskinde belirgin artış kaydedilmemiştir.

Sonuç olarak lityum, hipotiroidizm, hiperparatiroidizm ve kilo alma riskleri ile ilişkilidir. Lityum tedavisi gören çoğu hastada böbrek fonksiyonunda klinik olarak anlamlı azalma olduğuna dair çok az kanıt bulunmaktadır ve son evre böbrek yetmezliği

riski düşüktür. Konjenital malformasyon riski belirsiz olduğundan hamilelik sırasında lityum tedavisinin durdurulmasından önce risk dengesinin dikkatlice değerlendirilmesi gerekir. Hiperparatiroidizm prevalansının yüksek olması nedeniyle kalsiyum derişimi tedavi öncesi ve tedavi sırasında kontrol edilmelidir (McKnight vd., 2012).

Malhi, Gessler ve Outhred (2017) tarafından yayımlanan değerlendirmede, klinik uygulama yönergesine göre renal ve endokrin fonksiyonlarının düzenli olarak izlenmesi gerekliliğinin yanısıra hastanın bakım ve gözlem sürecinde ideal lityum plazma derişiminin 0,6-0,8 mmol/L olması gerektiği belirtilmiştir. Dolayısıyla, lityum'un 1,5 mEq/L kan düzeyinde toksisite oluşturma riski bulunduğundan kan lityum düzeyi dikkatle izlenmeli ve lityum dozu gerektiği şekilde ayarlanmalıdır.

Akut, akut-kronik ve kronik olmak üzere üç tip lityum zehirlenmesi vardır. Akut zehirlenme lityum tedavisi görmeyen bireylerde ortaya çıkar; tipik olarak, lityum ile tedavi edilen bir hastanın ilacının başka birisi tarafından yanlışlıkla yutulması sonucu görülebilir. Ayrıca intihar girişimi nedeniyle alınan lityum sonucu da ortaya çıkabilir. Akut zehirlenme genellikle daha düşük risk taşır ve hastalar lityum zehirlenmesinin diğer şekillerinde görüldüğünden daha hafif belirtilere sahiptir çünkü eliminasyon yarılanma ömrü düzenli lityum kullanmayan bireylerde daha kısadır (Timmer ve Sands, 1999).

Akut-kronik zehirlenme lityumla tedavi edilen hastaların aşırı doz kullanması sonucunda ortaya çıkar. Aşırı doz kullanımı özellikle depresyon tanısı konulan bipolar bozukluğu olan hastalarda kazayla veya kasıtlı olabilir. Bu zehirlenme biçimi lityum eliminasyon yarı ömrünün uzamasına bağlı olarak genellikle akut zehirlenmeden daha şiddetlidir. 3-4 mEq/L'nin üzerindeki serum derişimi çoğunlukla ciddi semptomlarla ilişkilidir ve genellikle hemodiyaliz gerektirir (Timmer ve Sands, 1999).

Kronik toksisite kronik lityum tedavisi alan hastalarda görülür. Kronik zehirlenme lityum dozu artması veya renal fonksiyon azalması sonucunda serum lityum düzeyinde artış olması sonucu ortaya çıkabilir. Kronik lityum zehirlenmesinin şiddeti doğrudan serum lityum derişimi ile ilişkili olup, hafif (1,5-2,0 mEq/L), orta (2,0-2,5 mEq/L) veya şiddetli (> 2,5 mEq/L) olarak sınıflandırılır (Timmer ve Sands, 1999). Bazen kan derişimi önerilen terapötik aralıkta olsa bile toksik semptomlar görülebilir.

Hafif lityum zehirlenmesi belirtileri arasında letarji, uyuklu olma, el titremesi, kas güçsüzlüğü, mide bulantısı, kusma ve diyare sayılabilir (Timmer ve Sands, 1999). Orta dereceli zehirlenme sonucunda ise konfüzyon, dizartri, nistagmus, ataksi, miyoklonik seğirme ve EKG değişiklikleri görülmektedir. Yaşamsal tehlike oluşturabilecek zehirlenmede ise, ciddi derecede bozulmuş bilinç, artmış tendon refleksi, nöbet, senkop, böbrek yetmezliği, koma ve hatta ölüm ortaya çıkabilmektedir.

### **2.3. İlaç Uygulama Yolları**

İlaç uygulama yolları, ilacın hedeflendirildiği bölgenin durumuna ve ilaçtan beklenen amaca göre lokal ve sistemik olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırılır.

#### **2.3.1. Epidermal uygulama**

Dermatolojik hastalık, açık yara ve yanık tedavisinde kullanılan uygulama yöntemidir. Merhem, krem, çözelti ve losyon gibi taşıyıcı sisteme yüklenmiş etkin madde doğrudan lezyon bölgesine uygulanarak lokal etki sağlanır (Erdal, 1991; Oktay ve Kayaalp, 2012).

#### **2.3.2. Konjonktiva üzerine uygulama (oftalmik yol ile uygulama)**

Konjonktival iltihaplarda, miyozis ya da midriyazis oluşturmada çözelti, süspansiyon veya pomad şeklinde hazırlanan oftalmik preparatların (kolir) alt konjonktiva kesesi içerisinde uygulandığı yoldur (Oktay ve Kayaalp, 2012; Karabacak, 2015).

#### **2.3.3. İntranazal uygulama**

Bazı nazal mukoza ve paranazal sinüs hastalıklarında antibakteriyel, vazokonstriktör, dekonjestan, antienflamatuvar veya lokal anestetik etkili sprey ya da damla şeklindeki ilaç çözeltisi bu yöntem ile nazal mukozaya uygulanmaktadır (Oktay ve Kayaalp, 2012; Karabacak, 2015).

#### **2.3.4. Dış kulak yoluna uygulama**

Dış kulak yolu ve kulak zarında oluşan bazı hastalıkların tedavisi için genellikle süspansiyon veya çözelti şeklinde hazırlanan otik preparatların lezyon bölgesine ulaşması için kulağa doğru pozisyon verildikten sonra damlatılarak uygulandığı uygulama yoludur (Erdal, 1991; Oktay ve Kayaalp, 2012).

### **2.3.5. Bukkal (ağız-içi) uygulama**

Ağız içerisinde oluşan yüzeysel enfeksiyon ve diğer lezyonlarda etkin madde bukkal tablet, pastil, ağız çözeltisi ve atuşman şeklinde lokal olarak uygulanabilir. Tonsilit, diş ve retrofarangeal enfeksiyon gibi durumlarda ise etkisiz bir uygulama yoludur (Oktay ve Kayaalp, 2012).

### **2.3.6. İntratekal uygulama**

Steril olarak hazırlanmış antibiyotik veya lokal anesteziik çözeltinin meninks (beyin zarı) veya spinal sinir kökünde lokal etki göstermesi amacıyla subaraknoit aralığa enjeksiyonuna dayalı uygulama yoludur. Intratekal enjeksiyonun uygulandığı omuriliği çevreleyen *dura mater*, araknoit ve *pia mater* ile araknoit ve *pia* arasındaki bölgeye ‘subaraknoit bölge’ adı verilir. Intratekal uygulama ile genellikle ‘lomber ponksiyon’ gerçekleştirilir (Zırh Gürsoy, 2004; Oktay ve Kayaalp, 2012).

### **2.3.7. İntravajinal uygulama**

Ovül, vajinal tablet, köpük, krem veya jel, vajina veya serviksin enfeksiyon durumunda ve yol açtığı kaşıntı, ağrı ve rahatsızlığı tedavi etmek için vajina içerisine aplikatör yardımıyla doğrudan uygulanır. Bunun dışında kontraseptif bazı spermisit ilaçlar da bu uygulama yolu ile koitus öncesi vajina içine uygulanmaktadır (Oktay ve Kayaalp, 2012; Karabacak, 2015).

### **2.3.8. İntraplevral ve intraperitoneal uygulama**

Antibakteriyel veya antineoplastik ilaçlar, plevra ve peritonun enfeksiyon veya kanser durumunda lokal etki elde etmek amacıyla enjeksiyon yöntemiyle uygulanabilmektedir.

### **2.3.9. İntrakardiyak enjeksiyon**

Acil durumda veya kalp ameliyatları sırasında kardiyak resüsitasyon amacıyla kullanılan adrenalin gibi bazı stimülan ilaçların kalbi doğrudan etkilemesi amaçlanarak miyokart içerisine ya da sistemik dolaşıma hızla girmesi için kalp boşluklarından birine enjekte edilmesidir. Uygulamada kalın ve özel bir enjeksiyon iğnesi kullanılır.

### **2.3.10. İntrauterin enjeksiyon**

Gebelerde tıbbi aborsiyon veya sezaryen sonrası uterusun büzülmesini hızlandırmak ve büzülmenin yarattığı mekanik etkiyle kanamayı azaltmak için kullanılan uygulama yoludur (Oktay ve Kayaalp, 2012).

### **2.3.11. İntraartiküler enjeksiyon**

Eklem enfeksiyonu ve hasarlı eklem tedavisi için eklem içerisine antibakteriyel veya kortikosteroid ilaçların enjekte edilmesi için kullanılan yoldur (Zırh Gürsoy, 2004; Oktay ve Kayaalp, 2012).

### **2.3.12. Rektum içine ve kolon içine uygulama**

Hemoroid, anal fisür gibi bazı rektum ve anüs hastalıklarında etkin maddeler supozituar, enema, lavman veya merhem gibi taşıyıcılar ile rektuma uygulanabilir. Kolonda görülen bazı hastalıklar için büyük hacimdeki çözelti lavman şeklinde uygulanabilmektedir. Ayrıca konstipasyon tedavisi veya görüntüleme öncesi hazırlık için bazı pürgatif ilaçlar da bu yolla uygulanabilir.

### **2.3.13. Lezyon içine uygulama**

Bu uygulama yolu seyrek olarak kullanılmakla beraber bazı tümöral veya enfeksiyon durumlarını tedavi için uygun ilaçların lezyon içerisine doğrudan uygulanmasını sağlar (Oktay ve Kayaalp, 2012).

### **2.3.14. Oral ilaç uygulama**

İlacın sistemik etki oluşturmasını sağlamak için gastrointestinal sistem (GİS) içerisine verildiği ve bu şekilde sindirim kanalındaki mukozal membranlardan emiliminin sağlandığı yoldur. Oral yolla verilen ilaçların emilim hızı midenin doluluğu, dozaj şekli ve etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri gibi bazı parametrelere göre değişkenlik gösterir. Tıpta %80 gibi yüksek oranda uygulama sıklığına sahip olmasına karşın oral uygulamanın parenteral verilise göre farmakokinetik bazı sorun ve sakıncaları vardır. Oral uygulanan ilaçların büyük çoğunluğu mide-barsak kanalından tümüyle emilemez. Hatta bazı ilaçların emilimi sahip olduğu fizikokimyasal özellik, mide asiditesi ve sindirim enzimleri gibi çeşitli nedenlerden dolayı önemli ölçüde düşer.

Emilen ilaç sistemik dolaşıma girmeden önce enzimatik etkinliğin yüksek olduğu karaciğer içinden geçer. Bu süreçte bireyden bireye farklılık gösteren ilaç inaktivasyonu (ilk-geçiş-etkisi, presistemik eliminasyon) gerçekleşir (Erdal, 1991; Oktay ve Kayaalp, 2012).

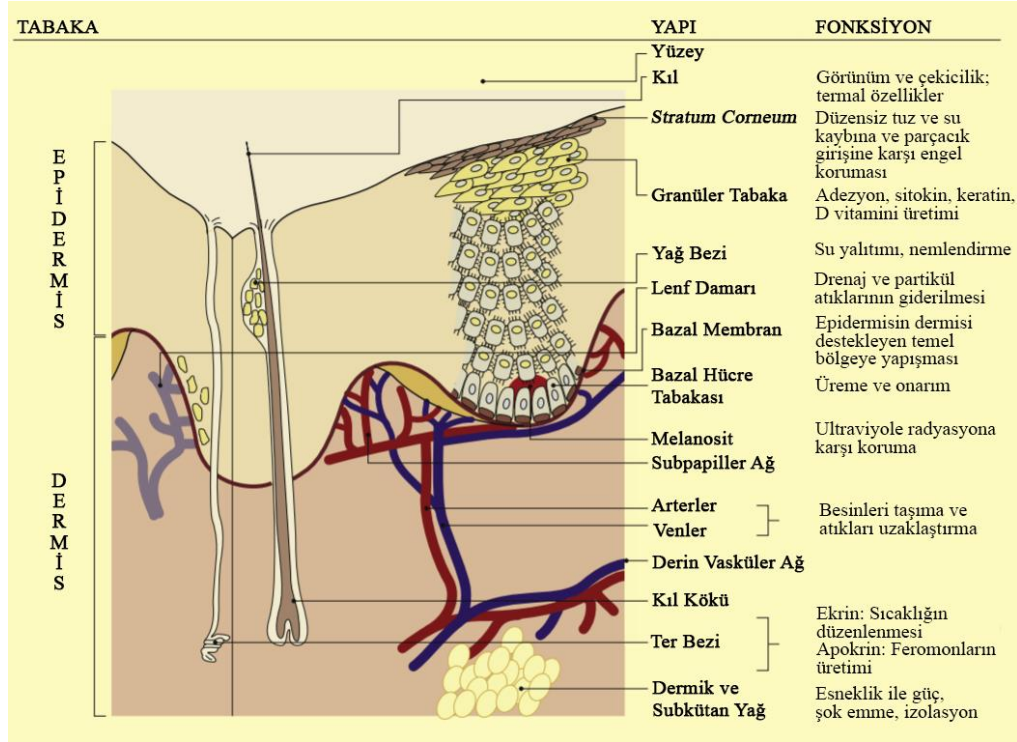
### **2.3.15. Cilt içine (intradermal) enjeksiyon**

Diğer parenteral yollar ile karşılaştırıldığında ilaç emilim hızı ve uygulanabilen sıvı hacmi oldukça düşüktür. Bu nedenle genellikle tanı amacıyla kullanılır. Deri içerisine

hacmi 0,1 mL'yi aşmayan, çeşitli alerji veya bakteriyoloji tesleri için veya lokal anestezi oluşturmak amacıyla hazırlanan çözelti bu yolla uygulanabilmektedir (İnanç vd., 1996; Zırh Gürsoy, 2004; Oktay ve Kayaalp, 2012).

### 2.3.16. Deri altına enjeksiyon (s.c.- subcutan)

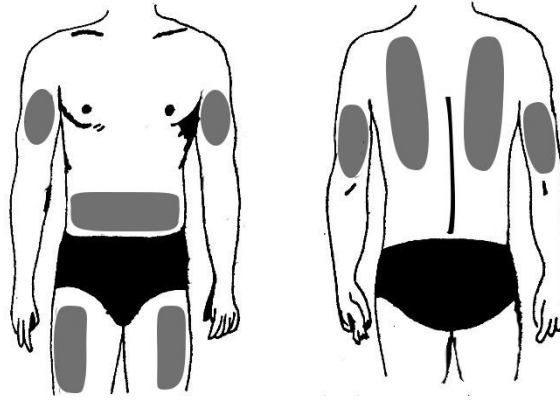
Deri epidermis, dermis ve hipodermis adı verilen üç tabakadan oluşur ve vücudumuzun en ağır organıdır. Sistemik etki yaratması istenilen ilaçlar derinin dermis tabakasının altına enjeksiyon ile uygulanır. Etkin madde Şekil 2.2'de derinin şematik şeklinde görüldüğü üzere dermis'in alt kısmındaki gevşek yağ dokusu içerisine yayılır ve emilerek şekilde görülen kılcıl damarlar aracılığıyla sistemik dolaşıma katılır (Venus, Waterman ve McNab, 2011; Oktay ve Kayaalp, 2012).



Şekil 2.2. Derinin yapısı ve fonksiyonları (Venus, Waterman ve McNab, 2011)

Subkütan doku kas dokusuna oranla damar açısından zengin değildir. Bu durumun sonucu olarak ilaç emilimi intramüsküler enjeksiyona göre daha yavaştır ve ilacın etki süresi bu uygulama ile uzatılabilir. Eğer hastanın dolaşım sisteminde herhangi bir sorun yoksa ve etkin madde deri altında bozunmuyorsa biyoyararlanım % 100 olur (Karabacak, 2015).

*S.c.* uygulama yapılacak bölgeler Şekil 2.3'te gösterilmiştir. Preparatların ciltte gerilim yaratmaması için hacminin 2 mL'yi aşmaması gereklidir. Enjekte edilecek sıvının hacmi yüksekse göbek altı bölgesinin karın derisi altına 5-10 mL düzeyine kadar enjeksiyon yapılabilir (Zırh Gürsoy, 2004; Oktay ve Kayaalp, 2012).



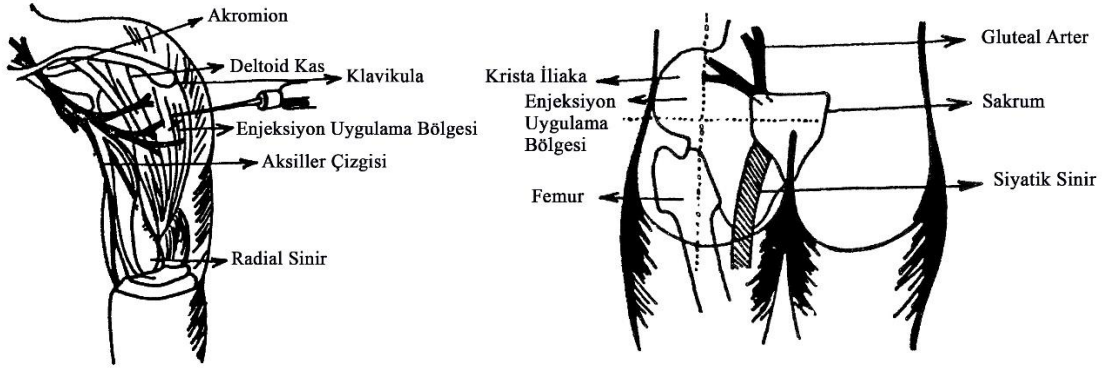
Şekil 2.3. Subkütan enjeksiyon bölgeleri (Erdal, 1991)

Belirlenen enjeksiyon bölgesine göre ilaç emilim hızı değişiklik gösterir. Emilim abdominal bölgeye en hızlı, kolda orta hızlı, geri kalan bölgelerde ise göreceli olarak daha yavaştır. Kaşektik yetişkin ve prematüre bebeklerde bu durum tekrar değerlendirilmelidir (Karabacak, 2015).

Bazı durumda deri altına implant yerleştirilerek etkin maddenin yavaş ve kontrollü salımı sağlanır. Bu süreç bazen aylarca uzatılabilir; böylece kronik tedavi gören hastalarda hasta uyuncu arttırılabilir (Oktay ve Kayaalp, 2012).

### **2.3.17. Kas içine enjeksiyon (i.m.- intramuscular)**

Bu enjeksiyon yolu ile ilacın kas içerisine verilmesi sağlanır. Herhangi bir hata sonucu yağ dokusu veya deri altına ilaç verilmemesi için yeterli kalınlıkta kas dokusunun bulunması gerekmektedir. Enjeksiyon için çoğunlukla Şekil 2.4'te görülen gluteal kas veya gerektiğinde deltoit kas kullanılır. Bebek ve küçük çocuklarda *vastus lateralis* veya *rektus femoris*, gluteal kasa göre daha fazla gelişim gösterdiğinden enjeksiyon için bu kasların tercih edilmesi daha doğrudur (Atalay, 1980; Erdal, 1991; Oktay ve Kayaalp, 2012).



Şekil 2.4. Kas içi enjeksiyonda genellikle kullanılan kas bölgeleri (Erdal, 1991)

Kas içerisine enjekte edilecek sıvı hacmi enjeksiyonun uygulanacağı kasa göre değişiklik gösterir. Kas içine genellikle 2 mL enjeksiyon yapılır ancak bu miktar 5 mL'ye kadar arttırılabilir. Gerekli görüldüğü durumda 10 mL'lik sıvı ikiye bölünerek sağ ve sol taraftaki kaslar içerisine enjekte edilebilir.

Kas içerisine enjekte edilen ilaç interstisyel sıvı içerisinde dağılır. Uygulanan ilaçtaki etkin maddenin molekül ağırlığı 3000'den düşük ise pasif difüzyon ile kapilerlerden kana karışır; 3000'den yüksek ise bir kısmı lenf damarları aracılığıyla emilir; molekül ağırlığı 20.000'den yüksek etkin madde ise tamamen lenf damarları aracılığıyla emilime uğrar. Dokulardaki kan akım hızı lenf akım hızının yaklaşık 1000 katı olduğundan lenf damarları ile emilen ilaçların emilim süresi çok uzundur (Atalay, 1980; Zırh Gürsoy, 2004; Oktay ve Kayaalp, 2012).

Kas içine uygulanan maddenin emilim hızını sınırlayan faktör etkin maddenin fizikokimyasal özelliği değil bölgedeki kan akımıdır. Dinlenme durumundayken kaslardan geçen kan akımının hızı deri altı bölgeyle birbirine yakındır, ancak egzersiz halinde olan kasta kan akımı daha fazla ve dolayısıyla ilaç emilim hızı daha yüksek olur. Hızlı emilim istenilen düşük hacimli ilaçların enjeksiyonu için deltoit kası tercih edilir. Geniş hacimli ve emilim hızının göreceli olarak düşük olması istenilen ilaçlar içinse gluteal kas tercih edilmelidir (Atalay, 1980; Oktay ve Kayaalp, 2012).

### 2.3.18. Damar içine enjeksiyon (i.v. – intravenöz)

Doğrudan damar içerisine yapılan enjeksiyon tipidir. Genellikle dirseğin ön yüzündeki antekübital fossa'da bulunan *median basilic vena* gibi içerisinden fazla kan

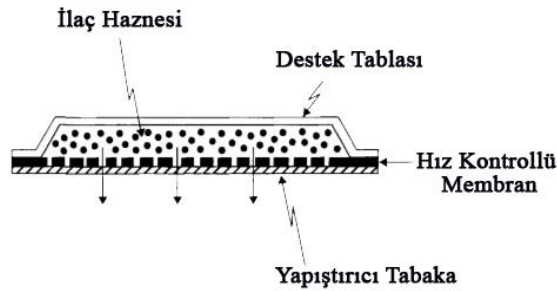
geçen yüzeyel büyük toplardamar kullanılır (Zırh Gürsoy, 2004; Oktay ve Kayaalp, 2012).

Damar içine enjeksiyon yapılacak sıvı hacmi 1 mL'den 1000 mL'ye kadar farklılık gösterebilir. Hacmi 10 mL'nin altında olan ilaçlar bu yolla verilirken, enjeksiyon bir veya birkaç dakika içerisinde tamamlanır. Daha yüksek hacimde verilecek ilaçlar için farklı süreye sahip yöntem bulunmaktadır. Hastaya ilaç uygulanırken reaksiyon gözlemlenmelidir. Bazı ilaçların hızlı enjeksiyonu dolaşım ve solunumu deprese ederek müdahale gerektiren duruma yol açabilir.

İ.v. enjeksiyon sonucunda biyoyararlanım %100'dür, ancak etkin madde etki yörnesine ulaşmadan karaciğer ve akciğerden geçerken yıkıma uğrayabilir (Oktay ve Kayaalp, 2012).

### 2.3.19. Transdermal uygulama

Etkin maddenin deriden emilerek sistemik dolaşıma girmesini sağlayacak özel farmasötik dozaj şekli (Şekil 2.5) içerisinde deri üzerine uygulanmasına transdermal ilaç uygulaması adı verilir. İlacın yüklendiği dozaj şekli koruyucu membran, ilaç haznesi, hız kontrollü membran ve yapışkan tabakadan oluşur. Bu sistemlerin toplam kalınlığı ortalama 0,5 mm'dir.



Şekil 2.5. Transdermal Sistem (Erôs, 2011)

Transdermal olarak uygulanacak dozun genellikle bir veya birkaç mg ile sınırlı olması, bazı etkin maddelerin lokal iritasyona neden olması, etkinin geç başlaması (*burst-effect* sağlanamaması) ve uygulama bölgesine göre emilim hızının değişmesi bu sistemlerin yalnızca sınırlı sayıda ilaca uygulanabilmesine olanak sağlamıştır (Zırh Gürsoy, 2004; Erôs, 2011; Oktay ve Kayaalp, 2012).

### 2.3.20. İnhalasyonla ilaç uygulama

Lipit/su partiyon katsayısı yüksek ve molekülü ufak olan ilacın solunum sistemi ile akciğerdeki alveoller aracılığıyla kana verilmesi işlemine inhalasyonla ilaç uygulama adı verilir. Bu yoldan ilaç uygulaması ölçülü doz inhaler veya nebulizör aracılığıyla ince toz veya aerosol şeklinde yapılabilir. Alveollerden etkin madde emilimini etkileyen parametreler arasında ilacın fizikokimyasal özelliği ve solunum sisteminin morfolojik/fizyolojik özellikleri vardır.

Akciğerde bulunan yaklaşık 300-400 milyon alveol sayesinde emilim gerçekleşen yüzeyin çapı 200 m<sup>2</sup>'yi bulmaktadır. Aynı zamanda akciğer kapiler yönünden oldukça zengindir ve kan damarlarından bir dakikada geçen kan hacmi vücudun geri kalan tüm kısımlarından geçen kanla eşit miktardadır. Bu durumda alveollere ulaşabilecek özelliğe sahip ilaç için en uygun uygulama yöntemi inhalasyondur (Gönül, 2004; Oktay ve Kayaalp, 2012).

### 2.4. Parenteral Preparat

*Para* ve *enteron* kelimelerinin birleşmesinden oluşan parenteral kelimesi barsak haricindeki organlar anlamında kullanılmaktadır. Parenteral preparatlar insan yada hayvan vücuduna enjeksiyon, infüzyon yada implantasyon yolu ile verilerek kullanılmak üzere tasarlanan steril preparatlardır. İlacın parenteral yolla verilmesinde birden fazla amaç vardır; etkin maddenin sindirim sisteminde bozunması, hastanın oral yolla ilaç alamadığı durumlar, bazı psikiyatrik hastalıklar, hızlı rezorpsiyon ve etki istenilen durumlar bu amaçlardan bazılarıdır. Çoğu parenteral preparat uygulaması yardımcı sağlık profesyoneli ve enjektör veya uygulama seti gerektirir. Bunun yanısıra dokuda hasara neden olan ve hastaya acı ve korku veren uygulama yöntemidir (Geçgil, 1991; Oktay ve Kayaalp, 2012).

Parenteral olarak uygulanan ilaçlar genellikle %100, yani tam biyoyararlanıma sahiptir. Bazen ilaç etkin maddesi uygulandığı dokuda veya akciğerden ilk geçişte kısmen yıkıma uğrayarak biyoyararlanımı düşürebilir.

Parenteral uygulama için hazırlanan enjeksiyonluk preparatın steril olması gereklidir. Ayrıca kan pH'sına (7,4) yakın özellikte ve izotonik olması istenirse de kanın

tamponlayıcı özelliği pH ve izotoni değerine belirli ölçüde tolerans sağlar (Oktay ve Kayaalp, 2012).

Enjeksiyonluk süspansiyon intramüsküler veya subkütan yolla uygulanabilir. Bu tür süspansiyonların çalkalama ile kolayca tekdüze dispersiyon oluşturma özelliği olması istenir. Bu nedenle gerekliyse flokülasyon ajanları eklenmelidir. Genellikle katı madde oranı %0,5-5 derişimdedir ancak bazı özel durumlarda (antibiyotik süspansiyonu gibi) bu oran %30 düzeyine kadar yükselebilir. Preparatın parçacık boyutu ve dağılımı, reolojik özelliği ve zeta potansiyeli dikkat edilmesi gereken parametrelerdir. Parçacık boyutu 60 µm'yi geçmemelidir (Zırh Gürsoy, 2004).

## **2.5. Değiştirilmiş Salımlı Dozaj Şekilleri**

Değiştirilmiş salımlı dozaj şekillerinde, aynı yol ile uygulanmasına rağmen etkin madde salım hızı ve/veya yeri çabuk salımlı dozaj şekillerinden farklıdır. Bu değişim, özel formülasyon tasarımı ve/veya üretim yöntemleri ile elde edilir. Değiştirilmiş salımlı dozaj şekilleri arasında ağızdan, kas içinden, deri altından tatbik edilen değiştirilmiş salım ve transdermal dozaj şekilleri bulunur. Değiştirilmiş salım sistemleri etkin maddenin aynı yoldan uygulanan normal dozaj şeklinden farklı bir salıma sahip olduğu sistemlerdir (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014).

### **2.5.1. Uzatılmış salımlı dozaj şekilleri**

Uzatılmış salımlı dozaj şekilleri, aynı yoldan uygulanmasına rağmen normal salım yapan dozaj şekillerine kıyasla etkin maddenin uzatılmış salım gösterdiği değiştirilmiş salımlı dozaj şekilleridir (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014).

### **2.5.2. Geciktirilmiş salımlı dozaj şekilleri**

Geciktirilmiş salımlı dozaj şekillerinden etkin maddenin salımı, dozaj şeklinin uygulanmasından sonra belirli bir süre için ertelenir. Sonraki salım, çabuk salımlı dozaj şekline benzerdir (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014).

### **2.5.3. Multifazik salım dozaj şekilleri**

#### **2.5.3.1. Bifazik salım**

İlaç salımının birinci fazı, uygulamadan kısa bir süre sonra ilacın kan konsantrasyonunun terapötik seviyeye çıkarmasını sağlayan bir hızlı salımlı doz fraksiyonu ile belirlenir. İkinci uzatılmış salım fazı ise uzun bir süre boyunca etkili terapötik seviyenin muhafaza edilmesi için gerekli olan doz fraksiyonunu sağlar (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014).

#### **2.5.3.2. Peşpeşe salım**

Dozaj şeklinin belirli zaman aralıklarında açılması sonucu ilaç salımının sağlanması amaçlanmıştır (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014).

### **2.5.4. Çok dozlu**

Çok dozlu dozaj şekilleri bir jelatin kapsül içerisinde ya da bir tablette sıkıştırılmış halde, kontrollü salım sağlayan yardımcı maddeler içeren pelletler veya boncuklar gibi birden fazla doz içerir (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014).

### **2.5.5. Tek dozlu**

Tek birim dozaj formları sadece bir dozdan oluşur. Bu dozaj şekline örnek olarak ozmotik tabletler verilebilir (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014).

### **2.5.6. İntramüsküler/subkütan depo formülasyonları**

Bir enjeksiyonluk depo formülasyon genellikle etkin maddeyi belirli bir süre boyunca sürekli olarak serbest bırakan subkütan veya intramüsküler bir üründür. İmplantlar, deri altı depo formülasyonlarındandır (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014).

### **2.5.7. Transdermal ilaç taşıyıcı sistemler (TDDS)**

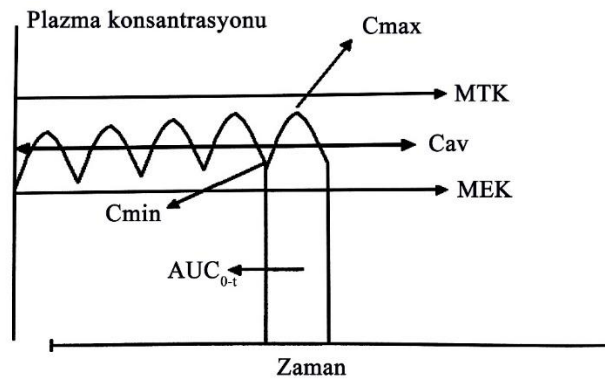
Transdermal ilaç taşıyıcı sistemler, sistemik etki yaratmak için hasar bulunmayan deriye uygulanacak bir veya daha fazla etkin madde veya maddeler içeren değişken büyüklükte esnek bir farmasötik preparattır (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014).

Etkin maddenin difüzyon ile salındığı matris sistemler ve etkin maddenin bir sıvı içerisinde dağılık olduğu, kontrollü salımın bir membran aracılığıyla sağlandığı rezervuar sistemler olmak üzere difüzyon şekline bağlı olarak iki ana tipte TDDS vardır (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1, 2014). Bölüm 2.3.19’da rezervuar sistemler daha geniş kapsamda ele alınmıştır.

## 2.6. Kontrollü Salım Sistemi

Geleneksel dozaj şekillerinin aksine etkin madde salımını daha uzun sürede ve kontrollü olarak yapan dozaj şekillerine kontrollü salım dozaj şekilleri adı verilmektedir. Salım üzerinde farklı mekanizmayla değişiklik sağlasa da bu sistemlerin ortak özelliği etkin madde salımını hemen değil belirli bir süreç içerisinde gerçekleştirmesidir. Kontrollü salım sisteminden beklenen yüklü etkin maddenin bir kısmını hemen salarak terapötik etkiyi oluşturacak kan düzeyine en kısa sürede ulaşım ardından etkin madde kan düzeyinin istenilen süre boyunca sabit tutulmasını sağlamaktır (Ağabeyoğlu, 2002; Dash vd., 2010).

Geleneksel dozaj şekilleri kullanıldığında plazma ilaç düzeyinin etkin dozda kalmasını sağlayabilmek için dozlamamın sık aralıklarla tekrarlanması gereklidir. Tedavi sırasında hasta uyuncu ve bireye özgü farklılık gibi çeşitli nedenlerle plazma ilaç düzeyi Şekil 2.6’da grafik halinde gösterilen terapötik aralıktan çıkarak toksik veya etkisiz alana girebilir. Ancak kontrollü salım sistemde belirli dozda etkin madde alındıktan sonra plazma ilaç düzeyi Şekil 2.6’da gösterildiği gibi istenilen süre boyunca terapötik aralıkta kalır ve böylece tedavinin başarısı artarken hastanın sık aralıklarla ilaç kullanması gerekmez (Zırh Gürsoy, 2002).



Şekil 2.6. Kontrollü salım sisteminden salınan etkin maddenin kan derişim - zaman grafiği (Öner, 2002)

Tüm kontrollü salım sistemlerin amacı ilaç tedavisinin etkinliğini arttırmaktır. Etkinlikteki iyileşme, yan etki olasılığında düşme, tedavi sırasında gerekli uygulama sayısında azalma veya enjeksiyon gibi uzman gerektiren ilaç uygulamalarını ortadan kaldırarak kendisini gösterir. İlaç salımı üzerinde zamana veya dağılıma bağlı iki tür kontrol sağlanabilir.

İyileştirilmiş tedavi etkinliğinin yanı sıra kontrollü salım sistemi sayesinde tedavi daha düşük dozda gerçekleştirilebileceği için etkin maddenin potansiyel yan ve toksik etkisi azalmış veya tamamen ortadan kalkmış olur. Ayrıca yarılanma ömrü kısa olan etkin madde vücut içerisinde kapalı sistem içerisinde bulunacağından ortam koşullarından etkilenmez. Bu üstünlükler hastanın yaşam kalitesinin artmasını ve hasta bakımının kolaylaşmasını sağlar.

Kontrollü salım sistemleri ile ilaç salımının uzatılmasına ek olarak etkin maddenin istenilen bölge, doku, organ veya hücreye hedeflendirilmesi konusunda da başarılı çalışmalar yapılmıştır (Ulrich vd., 1999; Zırh Gürsoy, 2002).

## **2.7. *In Situ* Jelleşen Sistem**

*In situ* jelleşen sistem kontrollü salım sistem başlığı altında geliştirilen yeni sistemlerden birisidir. Bu sistemde sıcaklık, pH, ışık, elektromanyetik radyasyon ve biyomolekül gibi uyaranlara yanıt veren ve basit geri dönüşümlü faz değişimine uğrayan (çözelti-jel) hidrojeller kullanılmaktadır (Liu, 2015).

Son birkaç yılda, ilaç taşıma, hücre enkapsülasyonu ve doku onarımı gibi çeşitli biyomedikal uygulamalar için literatürde artan sayıda *in situ* jelleşen sistem bildirilmiştir (Ruel-Garièpy ve Leroux, 2004). Bu sistemler arzu edilen doku, organ veya vücut boşluğu içine jelleşmeden önce verilebilen enjektabl sıvılardır.

*In-situ* jel oluşumu sistemin fiziksel ya da kimyasal değişikliğinin sonucu olarak ortaya çıkar. Yukarıda da bahsedildiği gibi *in situ* jel oluşumuna yol açan birçok olası mekanizma olmasına karşın genellikle iyonik çapraz bağlanma ya da pH ve sıcaklık değişimine bağlı olarak jelleşen polimerler kullanılır (Ruel-Garièpy ve Leroux, 2004).

### 2.7.1. Sıcaklığa duyarlı *in situ* jelleşen sistem

Sıcaklığa duyarlı hidrojel ilaç taşıyıcı sistem araştırmalarında en çok çevreye duyarlı polimerler kullanılır. Çözeltiden jele geçişte, sıcaklığın artmasıyla tetiklenen biyomateryal kullanımı *in situ* oluşum yaklaşımında oldukça cazip bir yöntemdir. Bu sistem için ideal kritik sıcaklık, ortamın sıcaklığı yani fizyolojik sıcaklıktır; böylece herhangi bir kimyasal reaksiyon veya vücut dışında herhangi bir dış ısı kaynağı gerekmeden faz geçişi basit bir mekanizmayla oluşturabilir. Bu özellik sayesinde *in vivo* koşulda basitlik ve güvenlik elde edilir (Nirmal, Bakliwal ve Pawar, 2010; Jeong, Kim ve Bae, 2012).

Sıcaklığa duyarlı *in situ* jelleşen sistemde en sık kullanılan polimerler, Poloxamer<sup>®</sup>, ksiloglukan ve poli(*N*-izopropilakrilamid) türevleridir. Blok kopolimerler olarak bilinen PEO-polipropilen oksit türevleri ticari olarak Pluronic<sup>®</sup>, Poloxamer<sup>®</sup> ve Tetronics<sup>®</sup> şeklinde adlandırılmıştır. Pluronic<sup>®</sup> F-127 ya da onun kopolimeri olan Poloxamer<sup>®</sup> 407 ile hazırlanan sulu çözelti düşük sıcaklıkta (4-8 °C) akışkan sıvı iken sıcaklık arttıkça hazırlandığı orana bağlı olarak oda sıcaklığında ya da daha yüksek sıcaklıkta geri dönüşümlü jel şekline geçer (Almeida vd., 2014).

### 2.7.2. pH'ya duyarlı *in situ* jelleşen sistem

*In situ* jelin başka bir oluşum mekanizması jel oluşumunun pH değişimiyle indüklenmesidir. Bu tip sistemde, pH'ya duyarlı polimer çevresel pH değişimine yanıt olarak protonları kabul eden veya serbest bırakan asidik veya bazik grup içerir. Çok sayıda iyonize olabilen gruba sahip polimer 'polielektrolit' olarak bilinir. Polimer zayıf asidik (anyonik) grup içerirse dış ortamın pH değeri arttıkça hidrojin şişmesi artar, ancak zayıf bazik (katyonik) grup içerirse azalır. Anyonik pH değerine duyarlı polimerlerin çoğu poliakrilik asit'e (PAA- Carbopol<sup>®</sup>, karbomer) veya türevlerine dayalıdır. Benzer şekilde, pH 4'te akışkan olan polivinilasetat dietilaminoasetat çözeltisi nötr pH koşulunda hidrojel oluşturur (Nirmal, Bakliwal ve Pawar, 2010; Gupta ve Manocha, 2013).

### 2.7.3. İyonik çapraz bağlanma ile oluşan *in situ* jelleşen sistem

Polimerler çeşitli iyonların varlığında faz geçişine uğrayabilir. Vücut sıvısı içerisinde bulunan sodyum (Na<sup>+</sup>), kalsiyum (Ca<sup>+2</sup>), magnezyum (Mg<sup>+2</sup>) ve potasyum (K<sup>+</sup>) gibi iyonlar faz geçişine uygun ortam yaratır. Polisakkaritlerin bir kısmı iyonduyarlı

sınıfına girer ve iyonların değerliliğine göre jel oluşturur. Örneğin, k-karajenan düşük miktarda  $K^+$  varlığında sert ve kırılđan jel oluştururken, i-karajenan  $Ca^{+2}$  varlığında esnek jel oluşturur. Gelrite<sup>®</sup> ticari ismiyle bilinen gellan sakızı  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  gibi bir ve iki değerli katyon varlığı ile jelleşen anyonik polisakkarittir. Düşük metoksi pektinlerin jelasyonu iki değerlikli katyon, özellikle  $Ca^{+2}$ 'dan kaynaklanmaktadır (Nirmal, Bakliwal ve Pawar, 2010; Almeida vd., 2014).

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

<b>Madde Adı</b>	<b>Firma Adı</b>
Dimetil sülfoksit	: Applichem, Almanya
Diyaliz Membran	: Sigma-Aldrich, Almanya
Fosfat Tampon Tuzu Tableti	: Sigma-Aldrich, Almanya
Fötal sığır serumu	: Sigma-Aldrich, Almanya
Lityum Kalibrasyon Standardı	: SCP Science, Kanada
Lityum Karbonat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metil Paraben	: American Distilling, USA
MTT Boyası	: Applichem, Almanya
Penisilin/Streptomisin	: GIBCO, İngiltere
Pluronic® F127	: Sigma-Aldrich, Almanya
Poloxamer® 407	: Sigma-Aldrich, Almanya
RPMI 1640	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Bikarbonat	: Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	: Sigma-Aldrich, Almanya

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

<b>Cihaz Adı</b>	<b>Firma Adı</b>
Atomik Absorpsiyon Spektrometesi	: Analytik Jena, Almanya
Buzdolabı	: Arçelik, Türkiye
Büyük Kapasiteli Santrifüj	: Eppendorf, Almanya
CO <sub>2</sub> 'li Etüv	: Thermo Fisher, Amerika
Derin Dondurucu	: Liebherr Medline, Almanya
Distile Su Cihazı	: Millipore, Fransa
Etüv	: Nüve, Türkiye
Hassas Terazı	: Mettler Toledo, ABD
Infrared Spektrofotometresi	: Shimadzu, Japonya
İnkübatör Çalkalayıcı	: Eppendorf, Almanya
Laminar Akış Kabini	: Heal Force, Çin
Manyetik Karıştırıcı	: IKA, Almanya

Mikropipet	: Eppendorf, Almanya
Mikroskop	: Leica, Almanya
Parçacık Boyutu Analiz Cihazı	: Zeta Sizer Nano Series, İngiltere
pH Metre	: Mettler Toledo, ABD
Plaka Okuyucu	: BioTek, ABD
Reometre	: Brookfield, Amerika
Su Banyosu	: GFL, Almanya
Termometre	: Ebro, Germany
Ultrasonik Banyo	: Wisd Laboratory Instruments, Kore
Vorteks	: Jeitech, Kore

## 4. YÖNTEM

### 4.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışması

#### 4.1.1. Analitik yöntem geliştirme

Analitik amaçlı tüm çalışmalarda lityum karbonat ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) etkin maddesinin miktar tayini Analytik Jena ContrAA 700 marka ve modeline sahip Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile yapılmıştır (USP 24). Analytik Jena ContrAA 700 üzerinde yer alan Grafit Fırınlı Atomik Absorpsiyon ve Alevli Atomik Absorpsiyon yöntemlerinden biri olan Alevli Atomik Absorpsiyon yönteminin bu çalışmada seçilmesinin nedeni Grafit Fırınlı Atomik Absorpsiyon yöntemine göre göreceli olarak daha yüksek derişimleri (ppm) ölçebilmesi ve seyreltmeye duyulan gereksinimi azaltarak standart hatanın da düşmesini sağlamasıdır.

Lamba olarak 300W gücünde *Xenon short-arc* lamba kullanılmış ve *hot spot* modda çalışılmıştır. Yakıt olarak asetilen gazı kullanılmış ve ölçüm yapılan dalga boyu spektrometre cihazına ait yazılımın önerisine uygun olarak 3 farklı dalga boyunun denenmesi sonucu en yüksek absorbans değerini veren 670 nm olarak seçilmiştir.

Cihazın kalibrasyonunda SCP Science, Kanada lityum standardı kullanılmış ve miktar tayini hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile gerçekleştirilmiştir. Cihaz çalışma koşulları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** *Alevli atomik absorpsiyon spektrometresi çalışma koşulları*

<b>Cihaz</b>	Analytik Jena ContrAA 700
<b>Lamba</b>	Xenon short-arc 300W
<b>Yakıt</b>	Asetilen
<b>Dalga Boyu</b>	670 nm
<b>Dedektör</b>	CCD array dedektörü

#### 4.1.2. Validasyon

Analitik yöntem validasyonunda hedeflenen amaç, yapılan analizler için kullanılan yöntemin doğruluk ve güvenilirliğinin veriler aracılığıyla yöntem geçerliliğinin kanıtlanmasıdır. Validasyon çalışmasında doğrusalık, doğruluk ve kesinlik gibi analitik parametreler Uluslararası Harmonizasyon Konseyi (ICH) belirlenen istatistiklere göre gerçekleştirilmiş ve değerlendirilmiştir (ICH Topic Q2B).

Bu çalışmada çözücü olarak saf su (pH 7,0) ve PBS tablet ile tamponlanmış (pH 7,4) su kullanılmıştır. Deneylerde salım özelliğinin belirlenmesi ve etkin madde miktar tayini için her iki çözücüyü ayrı ayrı kullanarak iki farklı analitik yöntem validasyonu yapılmıştır. Validasyon çalışmasında doğrusalılık, doğruluk, kesinlik ve çalışma aralığı değerleri incelenmiştir.

#### **4.1.2.1. Doğrusallık**

Analitik yöntemin doğrusalılığı, belirli derişimde hazırlanan stok çözeltiden çalışma aralığı içinde farklı derişime seyreltilen örnekler ile doğru orantı oluşturan analiz sonuçlarını elde edebilme yeteneğidir.

Doğrusallık, örnek derişiminin fonksiyonu olarak sinyal grafiğinin görsel incelemesi ile değerlendirilmelidir. Doğrusal ilişki varsa, test sonuçları uygun istatistiksel yöntemlerle, örneğin en küçük kareler yöntemiyle regresyon çizgisi hesaplanarak değerlendirilmelidir. Bazı durumda, örneklerin derişimi arasında doğrusalılık elde etmek için regresyon çizgisinin hesaplanmasından önce test verilerine matematiksel dönüşüm uygulanır.

Bu çalışmada, regresyon eğrisinin hesaplanması amacıyla farklı derişimlerde 3 seri hazırlanmış ve bu örnekler Atomik Absorpsiyon Spektrometresi ile analiz edilerek absorbans değerleri bulunmuştur.

Lityum karbonat'ın saf su (pH 7,0) ve PBS tablet ile tamponlanmış (pH 7,4) su içinde üç seri halinde hazırlanmış çözeltisinde lityum karbonat miktarına karşılık gelen absorbans değerleri ile serilerin bilinen derişimleri kullanılarak regresyon eşitliği oluşturulmuştur.

#### **4.1.2.2. Doğruluk**

Analitik yöntemin doğruluğu, gerçek değer veya kabul edilmiş referans değer ile analiz sonucunda bulunan değer arasındaki yakınlıktır.

Analitik yöntemin doğruluğunu kanıtlayabilmek için, derişimi bilinen ve birbirinden farklı olan bağımsız en az 3 örneğin absorbans ölçümleri en az 3 kez tekrarlanmıştır. Her bir bilinen derişim için ortalama yüzde geri kazanım, her seri için bağıl standart sapma hesaplanmış ve %95 güven aralığı belirlenmiştir.

#### 4.1.2.3. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, aynı örnekten seyreltilen farklı derişimlerdeki seriler arasında her bir derişimin birbirine yakınlığını ifade eder.

Birbirinden bağımsız olarak 3 farklı derişimde etkin madde çözeltisi hazırlanmış ve her bir çözelti 3 kez tekrarlanarak elde edilen absorbans değerleri regresyon eşitliği yardımı ile derişim, standart sapma, varyasyon katsayısı ve güven aralığı değerleri belirlenmiştir.

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralığı içinde aynı çalışma koşullarındaki kesinliktir. Tekrarlanabilirlik testi 3 farklı derişimin 3'er kez ölçülmesi ile saptanmıştır.

#### 4.1.2.4. Çalışma aralığı

Analitik yöntemin çalışma aralığı, analitik prosedürün uygun kesinlik, doğruluk ve doğrusallığa sahip olduğunun kanıtlandığı, örneğin üst ve alt derişimleri dahil olmak üzere bu miktarlar arasındaki aralıktır.

Saf su ve fosfat tamponu içinde 0,1-100 µg/mL derişim aralığında hazırlanan 10 örneğin AAAS aracılığıyla absorbans değerleri elde edilmiş ve bu değerler ile oluşturulan çalışma aralığı eşitliğinde en yüksek doğrusallığı gösteren alan determinasyon katsayısı ile karşılaştırılarak saptanmıştır.

#### 4.1.2.5. Duyarlılık

Duyarlılık, analitik yöntemin analiz edilen örneğin en düşük derişimini saptayabilme ve tayin edebilme yeteneğidir. Saptama sınırı (LoD) değeri örnek içindeki analit derişiminin tam değer olarak en düşük düzeydeki miktarıdır; her zaman kantitatif olmayabilir. Miktar tayini sınırı (LoQ) değeri ise örnek içindeki analitin uygun doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak saptanabilen en düşük miktarıdır.

Analitik yöntemin saptama sınırı (LoD) ve miktar tayini sınırı (LoQ) aşağıda gösterilen eşitlikler ile belirlenmiştir.

$$LoD = \frac{3,3 \sigma}{S} \qquad LoQ = \frac{10 \sigma}{S} \qquad (4.1)$$

Burada;  $\sigma$  standart sapma,  $S$  eğimdir.

## 4.2. *In Situ* Jel Formülasyon Çalışması

Bu çalışmada hazırlanan *in situ* jel formülasyonlarda, sıcaklığa duyarlı *in situ* jelleşen polimer olarak Poloxamer® 407 ve Pluronic® F127, koruyucu madde olarak metil paraben ve çözücü olarak bidistile su kullanılmıştır.

### 4.2.1. Formülasyon geliştirme çalışması

#### 4.2.1.1. Etkin maddesiz formülasyon hazırlanması

Formülasyon geliştirme çalışmasına, yapılan kaynak taramasından elde edilen bilgi ile belirlenen alt ve üst sınırlar içerisinde farklı oranlara sahip polimer çözeltisi oluşturularak başlanmıştır. Yalnızca etkin madde eklenmemiştir. Koruyucu madde seçimi parenteral preparatlar için kullanıma uygun ve ekonomik olan maddeler arasından metil paraben olarak belirlenmiş ve literatürdeki oranlara uygun olarak %0,1 (a/a) derişimde kullanılmıştır (Gupta vd., 2007; Gupta, Velpandian ve Jain, 2010).

*In situ* jel formülasyonu hazırlanmasında sıcakta hazırlama yöntemi (*hot method*) ve soğukta hazırlama yöntemi (*cold method*) olmak üzere iki yöntem vardır. Sıcaklığa duyarlı jelleşen sistemlerde polimerlerin suda çözünebilmesi için uzun süreli karıştırma gerekmektedir. Karıştırma sırasında tamamen çözünme sağlanmadan önce homojen dağılmayan polimer yoğunluğunun fazla olduğu bölgelerde sıcaklığa bağlı olarak jelleşme oluşması karıştırma işleminin engellenmesine neden olabilir. Çözeltinin belirli bir süre sonra jelleşerek visköz durum alıp karışma prosesini engellememesi açısından sıcaklığa duyarlı jelleşen sistemlerin hazırlanmasında soğukta hazırlama yönteminin kullanılması daha uygundur (Rawat, Warade ve Lahoti, 2010; Güven, 2016).

Belirlenen oranlarda iki farklı polimer (Poloxamer® 407, Pluronic® F127) tartılarak taban çapı ~4,9 mm olan 100 mL hacme sahip behere konulmuştur. Beherlerin manyetik karıştırıcı üzerinde buz kalıpları yardımıyla soğutulmasının ardından sıcaklığı ~4 °C'ye getirilen hesaplı miktarda su behere eklenmiştir. Karıştırma işlemi 2 mm çapındaki manyetik balık ile 500 rpm hızda 24 saat boyunca sürdürülmüştür. Sıcaklığı sabit tutmak amacıyla buz kalıpları 4 saatlik aralarla yenilenmiştir. Koruyucu madde karıştırma işleminin son bir saatinde eklenmiştir. Hazırlanan formülasyon oranları ve kodları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.** *Etkin maddesiz formülasyon oranları (% a/a)*

Formülasyon	Poloxamer® 407	Pluronic® F127	Metil Paraben	Distile su
P11	11	-	0,1	ym 100
P12	12	-	0,1	ym 100
P13	13	-	0,1	ym 100
P14	14	-	0,1	ym 100
P14.25	14,25	-	0,1	ym 100
P14.50	14,50	-	0,1	ym 100
P14.75	14,75	-	0,1	ym 100
P15	15	-	0,1	ym 100
P15	15,5	-	0,1	ym 100
F11	-	11	0,1	ym 100
F12	-	12	0,1	ym 100
F13	-	13	0,1	ym 100
F14	-	14	0,1	ym 100
F15	-	15	0,1	ym 100
F16.5	-	16,5	0,1	ym 100
F17	-	17	0,1	ym 100
F18	-	18	0,1	ym 100
PF16	8	8	0,1	ym 100
PF16.25	8,125	8,125	0,1	ym 100
PF16.5	8,25	8,25	0,1	ym 100
PF17	8,5	8,5	0,1	ym 100
PF18	9	9	0,1	ym 100

#### 4.2.1.1.1. *Etkin maddesiz formülasyonun jelleşme sıcaklığı*

Parenteral olarak uygulanacak sıcaklığa duyarlı *in situ* jelleşen sistemde ideal sıcaklık vücut sıcaklığı olan 37 °C'dir. Hazırlanacak formülasyon seçiminde dikkat edilmesi gereken ilk parametre jelleşme sıcaklığıdır. Bu nedenle hazırlanan tüm formülasyonlar oda sıcaklığından 40 °C'ye kadar *Test Tüpü Eğme Yöntemi (Test Tube Tilting Method)* ile test edilmiştir. Formülasyonların sıcaklık ölçümü yapılırken termometre probu çözeltinin tam ortasında, sıcaklığın ortam sıcaklığına en geç ulaştığı bölgede tutulmuştur. Seçilen formülasyonlar oda sıcaklığından 40 °C'ye kadar yeniden *Test Tüpü Eğme Yöntemi*'nin 3 kez tekrar edilmesi ile test edilmiştir (Tsuji vd., 1991).

#### 4.2.1.1.2. *Etkin maddesiz formülasyonun pH ölçümü*

Hazırlanan formülasyonların pH ölçümü 4 °C, 25 °C ve 37 °C’de pH metre ile yapılmıştır.

#### 4.2.1.2. *Etkin maddeli formülasyonun hazırlanması*

Etkin maddesiz formülasyonlar arasından uygun jelleşme sıcaklığına ve pH değerine ve en düşük polimer derişimine sahip formülasyon etkin madde eklenmek üzere seçilmiştir.

Seçilen formülasyonlara, piyasa preparatındaki miktara uygun olarak 300 mg lityum karbonat içerecek kadar madde eklenmiştir. Etkin madde eklenmeden önce 50 µm çaplı elekten geçirilerek parçacık boyutu 60 µm’nin altında tutulmuştur. Eklenmesi gereken toplam madde miktarı 4.2 sayılı eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$A = \frac{C \times B}{D - C}$$

(4.2)

Burada; A eklenmesi gereken toplam etkin madde miktarı (g), B Etkin maddesiz formülasyon miktarı (g), C enjeksiyon yapılacak miktarda bulunması gereken etkin madde miktarı (g), D enjeksiyon yapılacak süspansiyon miktarı’dır (g).

Oluşan enjeksiyonluk süspansiyon karıştırmayla kolayca dağıldığı için flokülasyon ajanına gereksinim duyulmamıştır. Etkin maddesiz formülasyon geliştirme çalışmasındaki formülasyon hazırlama yöntemi aynı şekilde tekrarlanmış ve hesaplanan etkin madde son bir saatte koruyucu maddeyle birlikte formülasyona eklenmiştir.

#### 4.2.1.2.1. *Etkin maddeli formülasyonun jelleşme sıcaklığı*

*Test Tüpü Eğme Yöntemi* tekrarlanarak etkin maddeli formülasyon jelleşme sıcaklığı açısından yeniden test edilmiştir. Optimum jelleşme sıcaklığına ulaşmak ve etkin maddenin jelleşme sıcaklığına olan etkisini ortadan kaldırmak için etkin maddesiz formülasyonda elde edilen polimer oranları kısa aralıkta değiştirilerek *Test Tüpü Eğme Yöntemi* ile yeniden *in vitro* jelasyon çalışması yapılmıştır. Bulunan optimum oranla tekrar hazırlanan etkin maddeli formülasyonların jelleşme sıcaklığı *Test Tüpü Eğme Yöntemi* ile 3 kez tekrarlanarak belirlenmiştir.

#### 4.2.1.2.2. *Etkin maddeli formülasyonun pH ölçümü*

Hazırlanan etkin maddeli formülasyonların pH ölçümü 4 °C, 25 °C ve 37 °C’de pH metre ile yapılmıştır.

#### 4.2.2. **Formülasyon seçimi**

Yapılan formülasyon geliştirme çalışmasının ardından jelleşme sıcaklığı ve pH değerleri değerlendirilerek parenteral kullanıma en uygun olabilecek iki formülasyon seçilmiştir. Seçim sırasında ~37 °C’de jel halini almış, en düşük polimer derişimine sahip ve pH açısından vücut sıvısının pH’sı olan 7,4’e en yakın pH değerine sahip olan formülasyon göz önüne alınmıştır.

#### 4.2.3. *In situ* jel formülasyonunun fizikokimyasal açıdan değerlendirilmesi

Formülasyon geliştirme çalışması sonucunda seçilen *in situ* jel formülasyonları üzerinde jelleşme sıcaklığı, şişme, pH, reolojik davranış, infrared profil ve *in vitro* salım belirleme çalışması yapılmıştır.

##### 4.2.3.1. *Jelleşme kapasitesi*

Jelleşme kapasitesi, 37 °C’de tutulan 2 mL pH 7,4 fosfat tamponu içeren vial içine formülasyondan bir damla damlatılarak jel oluşumu görsel olarak jelasyon zamanı ve jelin çözünme süresi dikkate alınarak belirlenmiştir. Jel kapasitesi Tablo 4.3’te gösterilen belirteçleri kullanarak değerlendirilmiştir (Srividya, Cardoza ve Amin, 2001).

**Tablo 4.3.** *Jelleşme kapasitesi belirteçleri*

Görsel Değerlendirme	Belirteç
Jelleşme yok	-
Jelleşme birkaç dakika içerisinde oluştu ve hızla çözüldü	+
Jelleşme hemen oluştu ve birkaç saat kaldı	++
Jelleşme hemen oluştu ve uzun süre kaldı	+++

##### 4.2.3.2. *Şişme*

Şişme çalışması için 1 mL formülasyon diyaliz membrana konulup diyaliz membran kapatıcı ile kapatılmıştır. Yapay gözyaşı ortamına konulmadan önce ve belirlenen zaman aralığında 37 °C sıcaklıkta fosfat tamponu içinde bekletildikten sonra jel ağırlığı tartılmıştır. Şişme oranı eşitlik 4.3 kullanılarak hesaplanmıştır (Güven, 2016).

$$\text{yüzde şişme oranı}_t = \frac{\text{jel ağırlığı}_t - \text{jel ağırlığı}_{t_0}}{\text{jel ağırlığı}_{t_0}} \times 100 \quad (4.3)$$

Burada:  $t_0$  sıfırcı zaman,  $t$  örnek alınan zamanıdır.

#### 4.2.3.3. *Infrared (FTIR) profili*

Formülasyonların infrared ışık spektrumu Fourier Dönüşümlü İnfrared (Kızılötesi) Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak 500-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında ölçülmüştür.

#### 4.2.3.4. *pH ölçümü*

Hazırlanan *in situ* jelleşen formülasyonların pH ölçümü 4 °C, 25 °C ve 37 °C'de pH metre ile yapılmıştır.

#### 4.2.3.5. *Reolojik davranış*

Formülasyonların reolojik davranışı 25 °C ve 37 °C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta incelenmiştir. Kayma hızına karşı kayma gerilimi ve viskozite değişimi iki sıcaklıkta reometre kullanılarak kaydedilmiştir.

#### 4.2.3.6. *Parçacık boyutu analizi*

Formülasyonlara eklenen lityum karbonatın parçacık boyutu analizi SEM kullanılarak yapılmıştır. Görüntüler 5 kV-yüksek büyütme gözlem koşulu, şarjlanma azaltıcı gözlem modu ve SE görüntü sinyalinde alınmıştır. Etkin maddenin 8 farklı noktasından toplam 80 örnek alınarak bu örneklerin ortalama büyüklükleri ve standart hataları hesaplanmıştır.

#### 4.2.3.7. *Salım*

Piyasa preparatının salımı için farmakopede önerilen yöntem kullanılmıştır. Dissolüsyon cihazında 300 mg lityum karbonat içeren kapsül *Apparatus 1*'e yerleştirilmiştir. Salım ortamı olarak 900 mL saf su kullanılmış ve sepetler 100 rpm hızda karıştırılmıştır. Her örnek alımında 10 mL örnek alınmış ve eksilen miktar aynı sıcaklıktaki dissolüsyon ortamı ile tamamlanmıştır. Elde edilen örnek AAAS cihazında analiz edilmiştir (USP 24).

*İn vitro* salım çalışmasında diyaliz membranlı dissolüsyon sistemi kullanılmıştır. Her iki formülasyondan 300 mg etkin madde içeren miktar tartılarak 12000-14000 dalton por çaplı diyaliz membrana konulmuş ve membran 37 °C sıcaklıkta 900 mL dissolüsyon ortamı içine bırakılmıştır. Dissolüsyon ortamı olarak pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Her örnek alımında 10 mL örnek alınmış ve eksilen miktar aynı sıcaklıktaki dissolüsyon ortamı ile tamamlanmıştır. Elde edilen örnek AAAS cihazında analiz edilmiştir (Zhang vd., 2002; Nie vd., 2011; Güven, 2016).

Saf etkin maddenin *in vitro* salım çalışması formülasyonların salım çalışmalarıyla aynı yöntemle gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.4. *İn situ* jel formülasyonunun kararlılığı**

Hazırlanan etkin maddeli formülasyonların kararlılık çalışması için formülasyonlar 4°, 25° ve 40 °C sıcaklıkta 90 gün bekletilerek ve belirli aralıklarla (30., 60. ve 90. gün) fiziksel özelliğinin belirlenmesi için test edilmiştir.

##### **4.2.4.1. *Fiziksel görünüş***

4°, 25° ve 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonların fiziksel görünüşü 30., 60. ve 90. günlerde görsel olarak incelenmiş ve yorumlanmıştır.

##### **4.2.4.2. *Jelleşme sıcaklığı***

4°, 25° ve 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar için jelleşme sıcaklığı çalışması 30., 60. ve 90. günlerde tekrarlanmıştır.

##### **4.2.4.3. *Jelleşme kapasitesi***

4°, 25° ve 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar için jelleşme kapasitesi çalışması 90. günde tekrarlanmıştır.

##### **4.2.4.4. *Şişme***

4°, 25° ve 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar için şişme çalışması 90. günde tekrarlanmıştır.

#### **4.2.4.5. pH ölçümü**

4°, 25° ve 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonların 30., 60., ve 90. günlerdeki pH ölçümü 4 °C, 25 °C ve 37 °C’de pH metre ile yapılmıştır.

#### **4.2.4.6. Reolojik davranış**

4°, 25° ve 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonların reolojik davranışı 30., 60., ve 90. günlerde, oda sıcaklığında (25 °C) ve jelleşmesi istenilen sıcaklıkta (37 °C) ölçülmüştür.

#### **4.2.4.7. Infrared (FTIR) profili**

4°, 25° ve 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonların 90. gündeki spektrumu FTIR kullanılarak 500-4000 cm<sup>-1</sup> aralığında belirlenmiştir.

#### **4.2.4.8. Etkin madde miktar tayini**

4°, 25° ve 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonların etkin madde miktar tayini 90. günde daha önceden valide edilmiş atomik absorpsiyon spektrometresi yöntemi ile yapılmıştır.

### **4.3. Sitotoksosite**

Hücre destekli sitotoksosite deneyleri, etkin maddenin hücre çoğalması üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemek veya belirli süre içinde doğrudan sitotoksik etki göstermek üzere hücre ölümüne yol açan etkin madde derişimini taramak için sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre canlılığını saptamak amacıyla kullanılan bu yöntemler, enzim aktivitesi, hücre zarı geçirgenliği, hücre tutunması (yapışması/adheransı), ATP üretimi, ko-enzim üretimi ve nükleotit alımı gibi çeşitli hücre işlevlerini temel alır. Tetrazolyum indirgeme, resazurin indirgeme ve proteaz aktivite testi hücre canlılığını belirlemek için kullanılan başlıca yöntemlerdendir (Riss vd., 2016).

Enzim aktivitesine dayalı testler arasında bulunan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi canlı hücredeki mitokondriyel dehidrogenaz aktivitesini belirlemek için en çok bilinen yöntemdir. Hücre yaşayabilirliği ve sitotoksosite testlerinde yaygın olarak kullanımının yanısıra kolay, güvenli, yüksek tekrarlanabilirlik özelliğe sahip olması bu testin en büyük üstünlüğüdür. Yöntemde MTT boyası NADH tarafından mor formazana indirgendiğinde suda çözünmeyen formazan hücrede mor renkli iğne şekilli kalıcı kristaller oluşturur. Bu nedenle absorbans

ölçümünden önce kristalleri çözülmek için DMSO (dimetilsülfoksit) gibi organik çözücüye gereksinim duyulur. Hücrenin MTT'yi indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak değerlendirilir ve MTT testi sonucunda elde edilen boya maddesinin yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Uchida vd., 2009; Van Meerloo, Kaspers ve Cloos, 2011; Riss vd., 2016).

Bu çalışmada 3T3 fare embriyo fibroblast hücresi üzerine uygulanan MTT testinin aşamaları aşağıdaki gibidir.

- I. Hücreler 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren atmosfer ortamında, 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü kaplarında kültüre edildikten sonra tripsin ile kaldırılmış ve %10 FBS içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) besiyerinde süspansiyon haline getirilmiştir.
- II. *Thoma* lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler, 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarının her kuyucuğuna her bir kuyuda 2x10<sup>4</sup>/mL hücre süspansiyonu olacak şekilde eşit olarak aktarılmıştır.
- III. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücre süspansiyonunun üzerine farklı derişimde lityum içeren ve içermeyen formülasyonlar kuyucuklardaki hücre üzerine eklenmiş ve 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- IV. Kontrol grubu olarak 96 plakada seçilmiş kuyucuklara formülasyon konulmadan yalnızca besiyeri eklenmiştir.
- V. İnkübasyon süresi sonunda kuyucukta formülasyon içeren besiyeri uzaklaştırılmış, her bir kuyucuğa 20 µL (5 mg/mL) MTT boyası eklenmiş ve yeniden 4 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.
- VI. Bu sürenin sonunda MTT boyası kuyucuktan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklenerek 570 nm dalga boyunda çoklu plaka okuyucuda (Cytation 5, BioTek Instruments, ABD) renk değişimi belirlenmiştir.
- VII. Formülasyon eklenen kuyular için belirlenen absorbans değerleri kontrol hücresi değerleri ile karşılaştırılmış ve yüzde değer hesaplanarak grafiğe aktarılmıştır.
- VIII. Deney her bir derişim için 8 kuyuda 3'er kez tekrar edilerek yapılmıştır.

Yapılan deneyde lityum içeren *in situ* jelleşen formülasyonlar hücrelere 2,5, 5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 35 ve 50 mM derişimde uygulanmıştır. Sitotoksisite testi için her bir formülasyon ve saf etkin madde için 3 ayrı plaka ve çalışılan her bir derişim için 8 kuyu kullanılmıştır. Her bir formülasyonun absorbans değeri kuyularda ölçülen absorbansların

ortalaması alınarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlardan hesaplanan yüzde hücre canlılığı aynı koşulda herhangi bir formülasyon uygulanmamış yalnızca hücre kültür ortamı (RPMI) ile inkübe edilmiş kontrol hücrelerindeki canlılık %100 kabul edilerek belirlenmiştir. Ayrıca formülasyonlara ait IC<sub>50</sub> (hücrede %50 azalmaya yol açan madde derişimi) değerleri de saptanmıştır (Uchida vd., 2009; Van Meerloo, Kaspers ve Cloos, 2011; Riss vd., 2016).

## 5. BULGULAR

### 5.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışması

#### 5.1.1. Analitik yöntem geliştirme

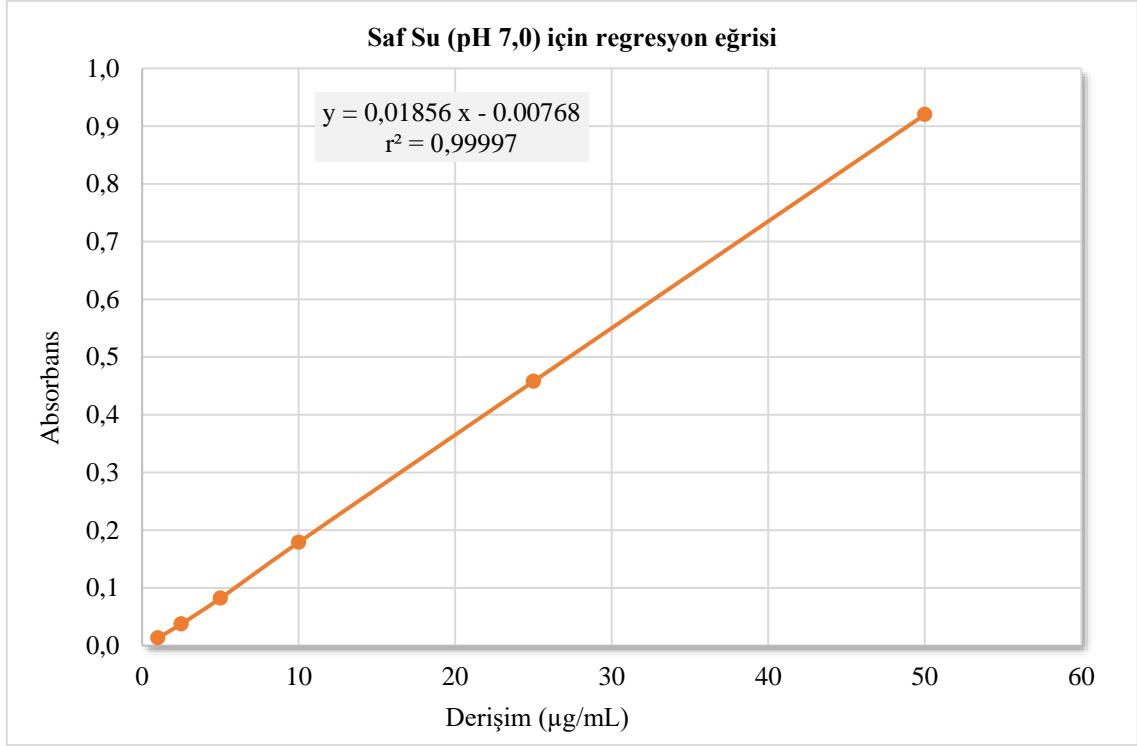
##### 5.1.1.1. Doğrusallık

###### 5.1.1.1.1. Saf su (pH 7,0)

Lityum karbonat'ın saf su (pH 7,0) içinde farklı derişimde hazırlanan üç seri çözeltilisini kullanarak elde edilen regresyon eşitliğinin doğrusal olduğu gösterilmiştir. Tablo 5.1'de derişime karşı absorbans değerleri, ortalama ve bu ortalamaların standart hatası verilmiş, Şekil 5.1'de de eşitlikten elde edilen eğrisi gösterilmiştir. Tablo 5.2'de ise her bir serinin ve serilerin ortalamasının regresyon eşitliğine ait eğim ve kesişim değerleri ile determinasyon katsayısı belirtilmiştir. Bir yöntemin doğrusallığının kanıtlanabilmesi için determinasyon katsayısının 0,999'dan yüksek olması gereklidir (ICH Q2/R1).

**Tablo 5.1.** Serilerin derişim ve absorbans değeri

Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbans				
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	ORT	SH
1	0,01325	0,01329	0,01324	0,01326	0,00002
2,5	0,03832	0,03713	0,03731	0,03759	0,00037
5	0,08408	0,08139	0,08105	0,08217	0,00096
10	0,17881	0,17998	0,17796	0,17892	0,00059
25	0,45523	0,45805	0,45989	0,45772	0,00136
50	0,91991	0,91788	0,92210	0,91996	0,00122



**Şekil 5.1.** Serilerin regresyon eğrisi (n=3)

**Tablo 5.2.** Serilerin regresyon eşitliğine ait eğim, kesişim ve determinasyon katsayısı

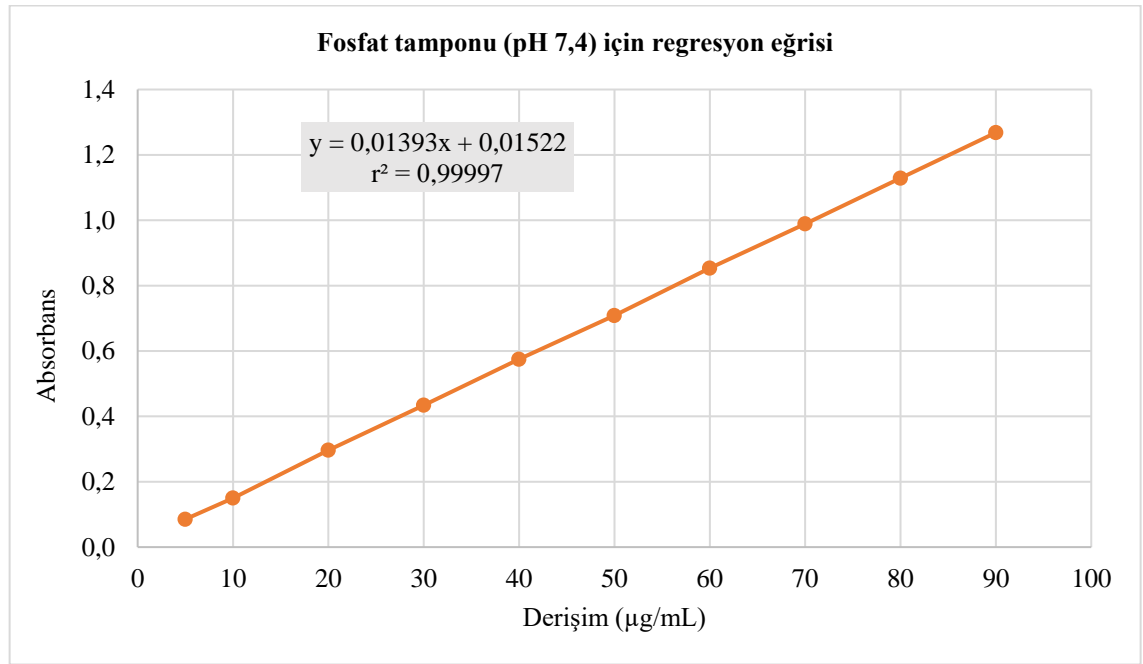
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama
<b>Determinasyon Katsayısı (<math>r^2</math>)</b>	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
<b>Eğim</b>	0,01853	0,01853	0,01863	0,01856
<b>y-kesişim</b>	-0,00721	-0,00747	-0,00836	-0,00768

#### 5.1.1.1.2. Fosfat tamponu (pH 7,4)

Lityum karbonat'ın fosfat tamponu (pH 7,4) içinde farklı derişimde hazırlanan üç seri çözeltisini kullanarak elde edilen regresyon eşitliğinin doğrusal olduğu gösterilmiştir. Tablo 5.3'te derişime karşı absorbans değerleri, ortalaması ve bu ortalamaların standart hatası ve Şekil 5.2'de eşitlikten elde edilen regresyon eğrisi gösterilmiştir. Tablo 5.4'te ise her bir serinin ve serilerin ortalamasının regresyon eşitliğine ait eğim ve kesişim değerleri ile determinasyon katsayısı belirtilmiştir.

**Tablo 5.3.** Serilerin derişim ve absorbans değeri

Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbans				
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	ORT	SH
5	0,08521	0,08503	0,08561	0,08528	0,00017
10	0,14968	0,15017	0,15010	0,14998	0,00015
20	0,29806	0,29972	0,29193	0,29657	0,00237
30	0,43896	0,43221	0,43081	0,43399	0,00252
40	0,57219	0,57852	0,57358	0,57476	0,00192
50	0,70660	0,70991	0,70943	0,70865	0,00103
60	0,85372	0,85317	0,85338	0,85342	0,00016
70	0,98835	0,98225	0,99595	0,98885	0,00396
80	1,12900	1,12720	1,13020	1,12880	0,00087
90	1,25690	1,26600	1,28120	1,26803	0,00709



**Şekil 5.2.** Serilerin regresyon eğrisi ( $n=3$ )

**Tablo 5.4.** Serilerin regresyon eşitliğine ait eğim, kesişim ve determinasyon katsayısı

	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ortalama
<b>Determinasyon Katsayısı (<math>r^2</math>)</b>	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999
<b>Eğim</b>	0,01385	0,01388	0,01393	0,01098
<b>y-kesişim</b>	0,01770	0,01699	0,01522	0,00768

### 5.1.1.2. Doğruluk

#### 5.1.1.2.1. Saf su (pH 7,0)

Her derişim için hesaplanan ortalama yüzde geri kazanım, bağıl standart sapma ve %95 güven aralığı Tablo 5.5'te gösterilmiştir. Bir yöntemin doğruluğunun kanıtlanması için yüzde geri kazanımı  $\pm$  %2 olmalıdır (ICH Q2/R1).

**Tablo 5.5.** Doğruluk çalışması sonucu

Bilinen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	50	10	5
	50,29152	10,18226	5,06996
Elde Edilen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	50,27806	10,26684	5,10174
	49,87925	10,01473	5,05613
	100,58305	101,82264	101,39920
Yüzde Geri Kazanım	100,55611	102,66838	102,03482
	99,75850	100,14733	101,12267
Ortalama Geri Kazanım	100,29922	101,54611	101,51890
%95 Güven Aralığı	0,13524	0,07408	0,01350
Standart Hata	0,58187	0,31873	0,05809

#### 5.1.1.2.2. Fosfat tamponu (pH 7,4)

Her bilinen derişim için hesaplanan ortalama yüzde geri kazanım, standart hata ve %95 güven aralığı Tablo 5.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 5.6.** Doğruluk çalışması sonucu

Bilinen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	60	30	5
	59,03165	30,50634	5,04442
Elde Edilen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	60,30341	30,57097	4,98747
	60,08295	30,29378	5,01928
	98,38608	101,68779	100,88847
Yüzde Geri Kazanım	100,50569	101,90322	99,74941
	100,13826	100,97926	100,38551
Ortalama Geri Kazanım	99,67667	101,52343	100,34113
%95 Güven Aralığı	1,68825	0,36026	0,07090
Standart Hata	0,39237	0,08373	0,01648

### 5.1.1.3. Kesinlik

#### 5.1.1.3.1. Saf su (pH 7,0)

Bölüm 4.1.2.3.'de anlatıldığı şekilde her bilinen derişim için hesaplanan standart sapma, varyasyon katsayısı ve güven aralığı değerleri Tablo 5.7'de gösterilmiştir.

Tablo 5.7. Kesinlik çalışması sonucu

1. gün			
Bilinen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	50	10	5
Elde Edilen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	50,45546	10,06914	5,07984
	50,54704	10,18334	5,11701
	50,26692	10,11277	5,15741
Ortalama	50,42314	10,12175	5,11808
Standart Sapma	0,14283	0,05763	0,03880
Varyasyon Katsayısı	0,28326	0,56934	0,75803
%95 Güven Aralığı	0,35480	0,14315	0,09638
2. gün			
Bilinen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	50	10	5
Elde Edilen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	50,19959	10,11870	5,00388
	50,55835	10,13378	5,09761
	51,97206	10,04436	5,07445
Ortalama	50,57667	10,09895	5,05865
Standart Sapma	0,38656	0,04787	0,04882
Varyasyon Katsayısı	0,76431	0,47402	0,96513
%95 Güven Aralığı	0,96028	0,11892	0,12128
3. gün			
Bilinen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	50	10	5
Elde Edilen Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	50,52819	10,08261	5,01519
	50,74258	10,16826	5,00173
	50,67525	9,97218	4,99796
Ortalama	50,64867	10,07435	5,00496
Standart Sapma	0,10964	0,09830	0,00906
Varyasyon Katsayısı	0,21647	0,97576	0,18106
%95 Güven Aralığı	0,27236	0,24419	0,02251

Bir yöntemin kesinliğinin kanıtlanması için varyasyon katsayısının 2'den düşük olması gereklidir (ICH Q2/R1).

### 5.1.1.3.2. Fosfat tamponu

Bölüm 4.1.2.3.'de anlatıldığı şekilde her bilinen derişim için standart sapma, varyasyon katsayısı ve güven aralığı hesaplanmış ve Tablo 5.8.'de verilmiştir.

**Tablo 5.8. Kesinlik çalışması sonucu**

<b>1. gün</b>			
<b>Bilinen Derişim (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>60</b>	<b>30</b>	<b>5</b>
	59,87111	30,50490	5,05811
<b>Elde Edilen Derişim (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	59,98242	29,98427	5,06314
	59,64132	30,56809	5,09761
<b>Ortalama</b>	59,83162	30,35242	5,07295
<b>Standart Sapma</b>	0,17395	0,32039	0,02150
<b>Varyasyon Katsayısı</b>	0,29073	1,05556	0,42380
<b>%95 Güven Aralığı</b>	0,43211	0,79589	0,05341
<b>2. gün</b>			
<b>Bilinen Derişim (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>60</b>	<b>30</b>	<b>5</b>
	59,55443	30,43309	5,00820
<b>Elde Edilen Derişim (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	59,99032	30,38641	5,08206
	60,49515	30,28947	5,05152
<b>Ortalama</b>	60,01330	30,36966	5,04726
<b>Standart Sapma</b>	0,47078	0,07326	0,03711
<b>Varyasyon Katsayısı</b>	0,78446	0,24123	0,73534
<b>%95 Güven Aralığı</b>	1,16948	0,18199	0,09220
<b>3. gün</b>			
<b>Bilinen Derişim (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>60</b>	<b>30</b>	<b>5</b>
	59,95872	30,32753	4,97337
<b>Elde Edilen Derişim (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	60,21509	30,09917	4,99851
	60,13322	29,93688	5,06529
<b>Ortalama</b>	60,10234	30,12119	5,01239
<b>Standart Sapma</b>	0,13094	0,19625	0,04751
<b>Varyasyon Katsayısı</b>	0,21786	0,65155	0,94776
<b>%95 Güven Aralığı</b>	0,32528	0,48752	0,11801

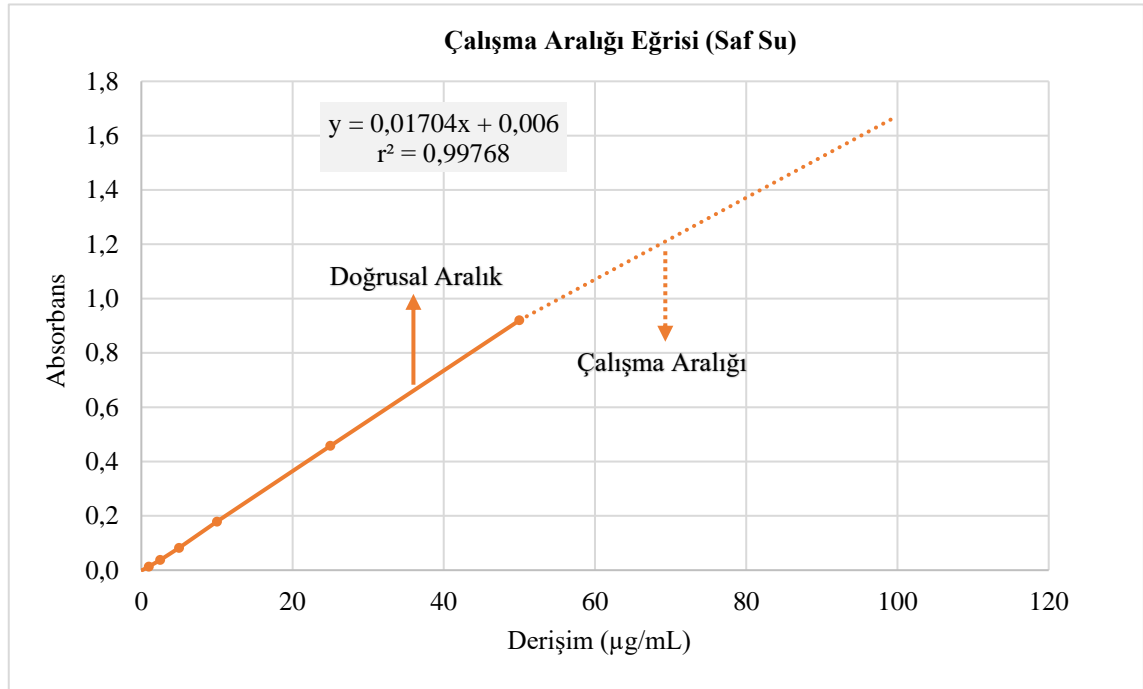
### 5.1.1.4. Çalışma aralığı

#### 5.1.1.4.1. Saf su

Bölüm 4.1.2.4.'de anlatıldığı şekilde elde edilen absorbans değerleri Tablo 5.9'da ve doğrusallığın kanıtlandığı çalışma aralığına ait derişim eğrisi, determinasyon katsayısı ve doğrusallığı kanıtlanan aralık Şekil 5.3'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.9.** Çalışma aralığı sonucu (saf su)

Derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbans			
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	ORT
0,10	0,00078	0,00035	0,00016	0,00043
0,25	0,00229	0,00237	0,00241	0,00236
0,50	0,00575	0,00591	0,00562	0,00576
1,00	0,01325	0,01329	0,01324	0,01326
2,50	0,03832	0,03713	0,03731	0,03759
5,00	0,08408	0,08139	0,08105	0,08217
10,00	0,17881	0,17998	0,17796	0,17892
25,00	0,45523	0,45805	0,45989	0,45772
50,00	0,91991	0,91788	0,92210	0,91996
100,00	1,67070	1,66970	1,67740	1,67260



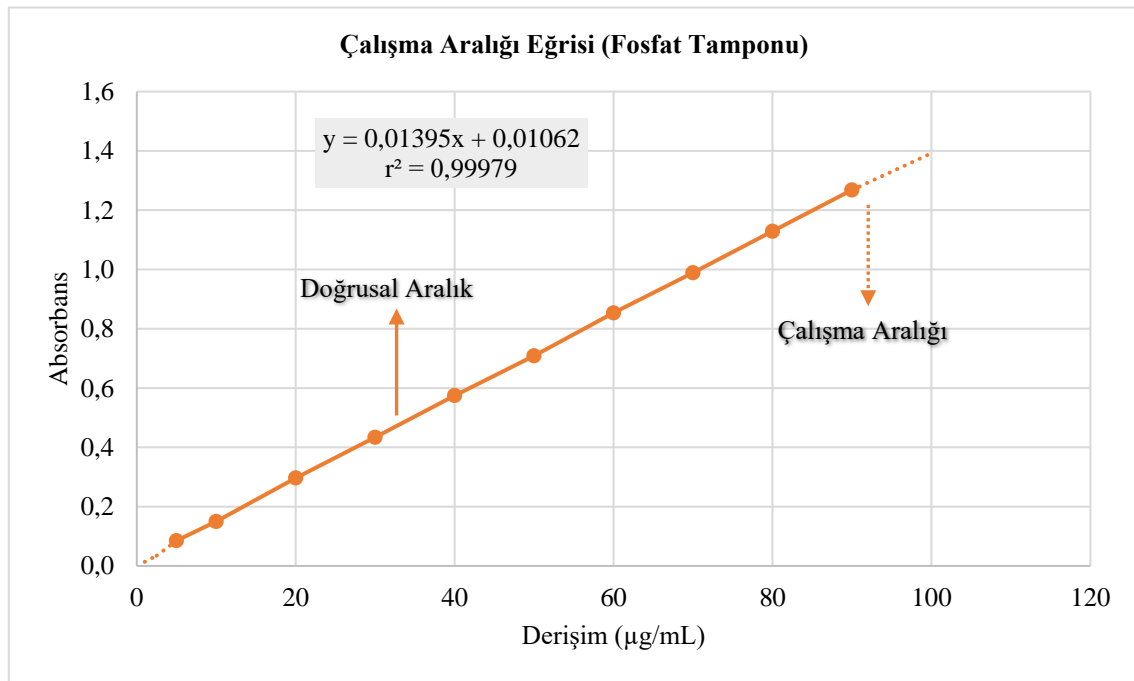
**Şekil 5.3.** Çalışma aralığına ait derişim eğrisi ( $n=3$ )

#### 5.1.1.4.2. Fosfat tamponu (pH 7,4)

Bölüm 4.1.2.4.'de anlatıldığı şekilde elde edilen absorbans değerleri Tablo 5.10'da ve çalışma aralığına ait derişim grafiği, determinasyon katsayısı ve doğrusallığı kanıtlanan aralık Şekil 5.4.'te sunulmuştur.

**Tablo 5.10.** Çalışma aralığı sonucu (fosfat tamponu)

Derişim (µg/mL)	Absorbans			
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	ORT
1	0,01380	0,01386	0,01409	0,01392
2,5	0,03450	0,03466	0,03522	0,03479
5	0,08521	0,08503	0,08561	0,08528
10	0,14968	0,15017	0,15010	0,14998
20	0,29806	0,29972	0,29193	0,29657
30	0,43896	0,43221	0,43081	0,43399
40	0,57219	0,57852	0,57358	0,57476
50	0,70660	0,70991	0,70943	0,70865
60	0,85372	0,85317	0,85338	0,85342
70	0,98835	0,98225	0,99595	0,98885
80	1,1290	1,1272	1,1302	1,12880
90	1,2569	1,2660	1,2812	1,26803
100	1,3801	1,3866	1,4091	1,39193



**Şekil 5.4.** Çalışma aralığına ait derişim eğrisi (n=3)

#### 5.1.1.5. Duyarlılık

Bölüm 4.1.2.5.'de verilen Eşitlik 4.1'e göre hesaplanan LoD ve LoQ değerleri saf su için Tablo 5.11'de, fosfat tamponu için Tablo 5.12'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.11.** *Duyarlılık çalışması bulgusu (saf su) (n=3)*

Sınır	Derişim $\pm$ SH
LoD (Saptama Sınırı)	0,27506 $\pm$ 0,00381
LoQ (Tayin Sınırı)	0,83351 $\pm$ 0,01155

**Tablo 5.12.** *Duyarlılık çalışması bulgusu (fosfat tamponu) (n=3)*

Sınır	Derişim $\pm$ SH
LoD (Saptama Sınırı)	0,61215 $\pm$ 0,06130
LoQ (Tayin Sınırı)	1,85499 $\pm$ 0,18576

LoD ve LoQ değerlerinin yöntemin regresyon eğrisindeki en düşük derişimden daha düşük olması yöntemin duyarlı olduğunu kanıtlamaktadır.

## **5.2. İn Situ Jel Formülasyon Çalışması**

### **5.2.1. Formülasyon geliştirme çalışması**

Etkin maddesiz ve etkin maddeli [etkin madde oranı %6 (a/a) olacak şekilde] formülasyonlar ayrı ayrı hazırlandıktan sonra jelleşme sıcaklığı ve polimer oranı göz önünde bulundurularak istenilen sıcaklıkta jelleşen en düşük polimer derişimine sahip formülasyonlar çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir.

#### **5.2.1.1. Etkin maddesiz formülasyon seçimi**

Etkin maddesiz formülasyonların jel/tamamen akışkan/visköz olduğu sıcaklık Tablo 5.13'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.13. Etkin maddesiz formülasyonların jelleşme sıcaklığı**

Formülasyon	Sıcaklık ( °C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
P11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P14.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P14.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	1	1	1
P14.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
P15	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1	1	1	1	1
F11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1
F17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
F18	½	½	½	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PF16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1
PF16.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
PF16.5	-	½	½	½	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PF17	½	½	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PF18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

-: Tamamen Akışkan                      ½: Visköz                      1: Jel

Etkin maddesiz formülasyonların jelleşme sıcaklığı değerlendirildiğinde P14.75, F17 ve PF16.5 kodlu formülasyonların ~37 °C’de jelleşen en düşük polimer derişimine sahip olduğu görülmüştür.

#### 5.2.1.1.1. Etkin maddesiz formülasyonların pH değeri

Etkin maddesiz formülasyonlarda yapılan değerlendirmede jelleşme sıcaklığı ve polimer oranı uygun bulunan formülasyonların pH değeri ölçülmüş ve Tablo 5.14’te gösterilmiştir.

**Tablo 5.14.** *Etkin maddesiz formülasyonların pH değeri*

	Formülasyon		
	P14.75	F17	PF16.25
4 °C	7,45	6,11	6,82
	7,45	6,10	6,83
	7,45	6,10	6,85
<b>Ortalama</b>	7,45	6,10	6,83
<b>Standart Hata</b>	0,000	0,003	0,009
25 °C	7,32	6,01	6,72
	7,32	6,01	6,72
	7,31	5,99	6,74
<b>Ortalama</b>	7,32	6,00	6,73
<b>Standart Hata</b>	0,003	0,007	0,007
37 °C	7,25	5,93	6,70
	7,25	5,92	6,68
	7,24	5,92	6,67
<b>Ortalama</b>	7,25	5,92	6,68
<b>Standart Hata</b>	0,003	0,003	0,003

### 5.2.1.2. *Etkin maddeli formülasyon seçimi*

Etkin maddesiz formülasyonlarda yapılan jelleşme sıcaklığı ve pH değerleri göz önünde bulundurularak ~37 °C’de jelleşen ve vücut pH’sına en yakın pH değerine sahip olan ve en düşük polimer derişime sahip P14.75 ve PF16.25 formülasyonları seçilmiştir. Seçilen formülasyonlara yakın polimer derişimlerinde yeni in situ jelleşen çözeltiler içlerine etkin madde eklenmek üzere hazırlanmıştır. Etkin madde içeren formülasyonların bileşenleri Tablo 5.15’te sunulmuştur. Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanan etkin madde Bölüm 4.2.1.4.’de anlatıldığı gibi formülasyonlara eklenmiştir.

**Tablo 5.15.** *Etkin maddeli formülasyon çözeltilisinin polimer ve koruyucu madde derişimi (% a/a)*

Formülasyon	Poloxamer® 407	Pluronic® F127	Metil Paraben	Distile su
EP14.75	14,75	-	0,1	ym 100
EP15	15	-	0,1	ym 100
EP17	17	-	0,1	ym 100
EPF16.25	8,125	8,125	0,1	ym 100
EPF16.5	8,25	8,25	0,1	ym 100
EPF17	8,5	8,5	0,1	ym 100
EPF18	9	9	0,1	ym 100

S.c. veya i.m. olarak uygulanabilecek olan 5 mL hacmini geçmeyen en yüksek formülasyon ağırlığı olarak belirlenen 5 g enjeksiyon çözeltisi için 30 g hazırlanan etkin maddeli formülasyon üzerine Eşitlik 3 ile hesaplanan 1,91489 g etkin madde eklenmiştir. Böylece her 5 g etkin maddeli formülasyonun piyasa preparatının içerdiği etkin madde miktarına eşit olarak 0,3 g lityum karbonat içermesi sağlanmıştır.

#### 5.2.1.2.1. Etkin maddeli formülasyonların jelleşme sıcaklığı

Jelleşme sıcaklığı, etkin maddenin fizikokimyasal özelliğine ve farklı formülasyon oranlarının jelleşme sıcaklığına etkisinin incelenmesi ve ayrıca etkin maddeli formülasyonların jelleşme sıcaklığının optimize edilmesi için belirlenmiştir.

Etkin maddeli formülasyonların jel/tamamen akışkan/visköz olduğu sıcaklık Tablo 5.16’da gösterilmiştir.

**Tablo 5.16. Etkin maddeli formülasyonların jelleşme sıcaklığı**

Formülasyon	Sıcaklık ( °C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP14.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½
EP15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
EP17	½	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EPF16.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
EPF17	-	-	-	½	½	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EPF18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	-: Tamamen Akışkan								½: Visköz				1: Jel			

#### 5.2.2. Formülasyon seçimi

Hazırlanan etkin maddeli formülasyonlar arasından ~37 °C’de jel şeklinde olan ve en düşük polimer derişimine sahip EP15.5 ve EPF16.5 formülasyonu daha ileri çalışmalar için seçilmiştir. Seçilen etkin maddeli formülasyonların içeriği Tablo 5.17’de verilmiştir.

**Tablo 5.17.** Formülasyonlarda etkin madde, polimer ve koruyucu madde derişimi (% a/a)

Formülasyon	Etkin Madde (%)	Poloxamer® 407 (%)	Pluronic® F127 (%)	Metil Paraben (%)	Distile su (%)
EP15.5	6	14,57	-	0,1	ym 100
EPF16.5	6	7,755	7,755	0,1	ym 100

### 5.2.3. Formülasyon üzerinde yapılan çalışma

#### 5.2.3.1. Fiziksel görünüş

EP15.5 ve PF16.5 formülasyonların her ikisinin görünümünde de altta kolayca dağılıbilir beyaz lityum karbonat tozlarının birikimi ve üstte saydam tabaka bulunmaktadır; karıştırma ile koloidal süspansiyon hale getirildiğinde opak görünüm kazanmaktadır.

#### 5.2.3.2. Jelleşme kapasitesi

Hazırlanan formülasyonların jelleşme kapasitesi Tablo 5.18’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.18.** *In situ* jel formülasyonlarının jelleşme kapasitesi

Formülasyon	Jelleşme Kapasitesi
EP15.5	+++
EPF16.5	+++

#### 5.2.3.3. Şişme

Hazırlanan formülasyonların zamanla değişen şişme oranı Tablo 5.19.’da gösterilmiştir.

**Tablo 5.19.** *In situ* jel formülasyonlarının şişme oranı (n=3)

Zaman (saat)	Şişme Oranı (% ± SH)	
	EP15.5	EPF16.5
0,5	45,4729 ± 0,3435	65,0255 ± 0,4972
1	86,3748 ± 0,4368	94,6413 ± 0,4442
2	98,2412 ± 0,7269	107,5720 ± 0,7239
3	106,4714 ± 0,5032	123,7686 ± 0,6616
4	113,1675 ± 0,7042	140,8981 ± 0,9855
8	122,0086 ± 0,2691	168,4580 ± 0,3932
12	135,4168 ± 0,2424	192,4240 ± 0,4785
24	149,4164 ± 0,3103	219,2340 ± 0,3597

#### 5.2.3.4. pH ölçümü

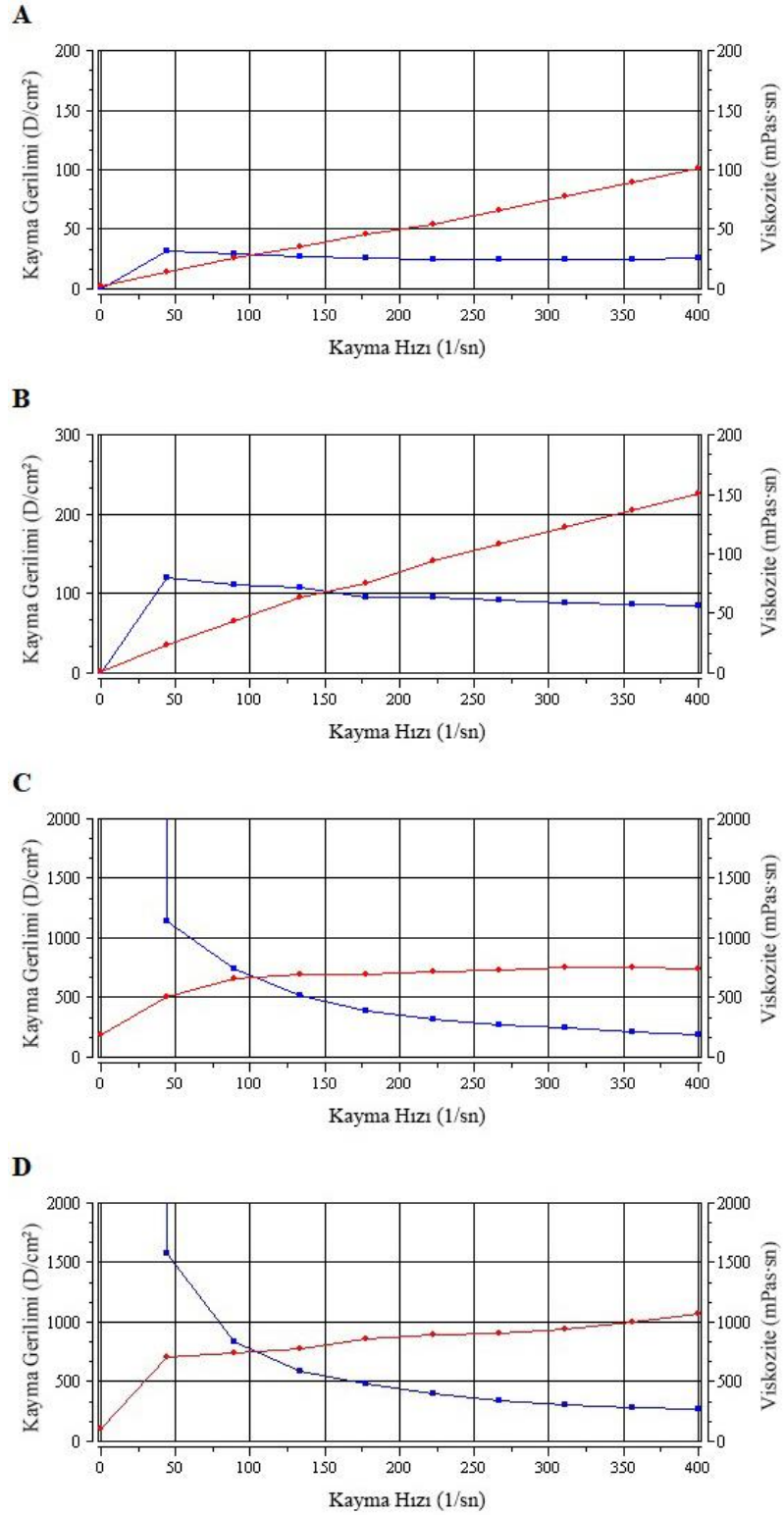
Hazırlanan formülasyonların sıcaklık ile değişen pH değeri Tablo 5.20’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.20.** Formülasyonların sıcaklığa bağlı pH değeri (n=3)

Formülasyon	pH değeri ± SH		
	4 °C	25 °C	37 °C
EP15.5	10,627 ± 0,003	10,107 ± 0,009	9,717 ± 0,003
EPF16.5	9,767 ± 0,007	9,213 ± 0,009	8,775 ± 0,004

#### 5.2.3.5. Reolojik davranış

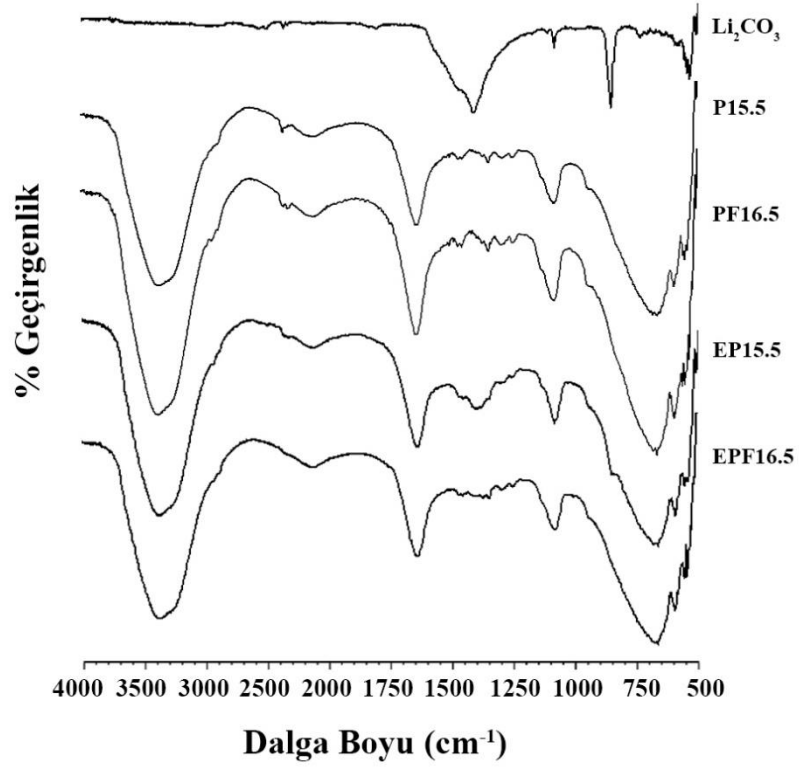
Formülasyonların 25 °C ve 37 °C olmak üzere iki farklı sıcaklıktaki kayma hızına karşı kayma gerilimi ve viskozite değişimleri Şekil 5.5’te verilmiştir.



**Şekil 5.5.** Formülasyonlara ait reogram (A: 25 °C EP15.5, B: 25 °C EPF16.5, C: 37 °C EP15.5, D: 37 °C EPF16.5, —: Kayma gerilimi, —: Viskozite)

### 5.2.3.6. *Infrared (FTIR) profili*

Hazırlanan formülasyonların ve etkin maddenin FTIR profili Şekil 5.6’da sunulmuştur.



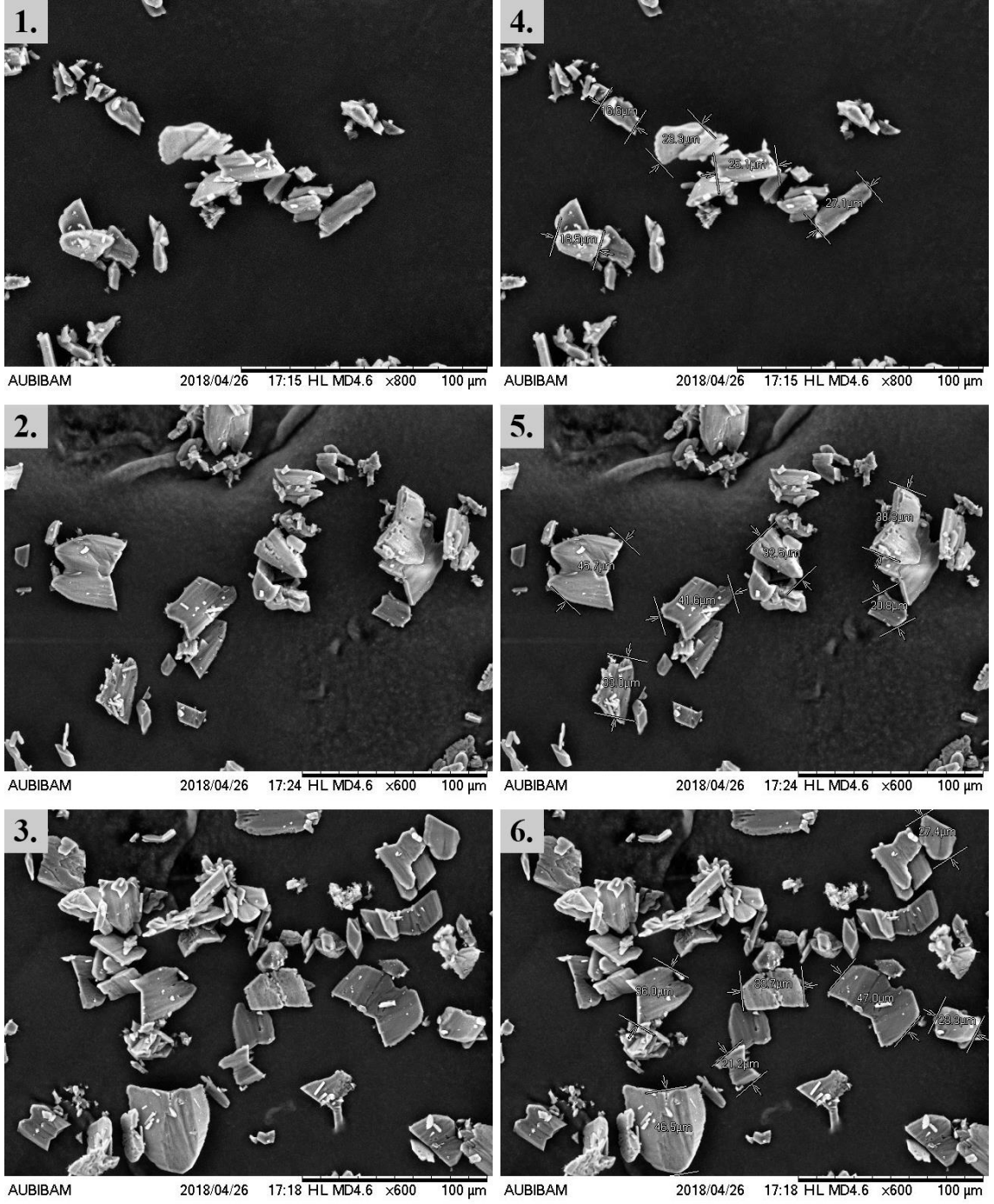
Şekil 5.6. Lityum karbonat ve formülasyonların FTIR spektrumu

### 5.2.3.7. *Parçacık boyutu analizi*

Formülasyonlara eklenen lityum karbonat’ın hesaplanan ortalama parçacık boyutu ve standart hatası Tablo 5.21’de ve SEM görüntüsü ile örnek ölçümler Şekil 5.7’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.21.** Etkin maddenin parçacık boyutu (n=80)

Etkin Madde	Parçacık Boyutu (µm)	Standart Hata
Lityum Karbonat	22,925	2,463



Şekil 5.7. Lityum karbonat örneğinin 3 farklı bölgesinden alınan SEM görüntüleri (4,5 ve 6 numaralı görseller 1,2 ve 3 numaralı görsellerdeki bazı etkin madde kristallerinin ölçümlerinin gösterildiği görsellerdir.)

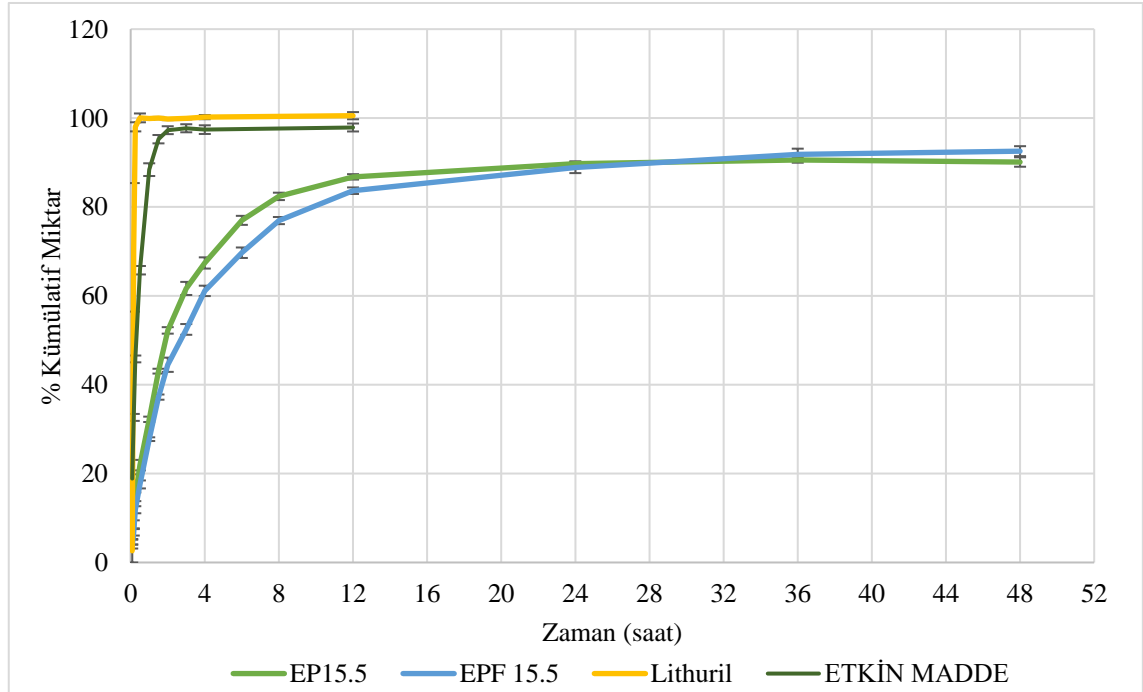
### 5.2.3.8. Salım

Piyasa preparatı (Lithuril®), saf etkin madde ve hazırlanan formülasyonların *in vitro* salım profili Tablo 5.22’de ve salım profillerinin matematiksel modellere

uyumluluğu Tablo 5.23'te sunulmuştur; verileri kullanılarak hazırlanan *in vitro* salım profili ise Şekil 5.8'de gösterilmiştir.

**Tablo 5.22.** Zamana karşı kümülatif çözünen etkin madde miktarı

Zaman (saat)	Etkin Madde		Lithuril®		EP15.5		EPF16.5	
	%	SH	%	SH	%	SH	%	SH
5. dk	18,87	0,96	2,64	2,64	4,58	0,54	3,58	0,44
10. dk	32,64	0,78	70,91	14,46	8,58	0,90	6,79	0,73
15. dk	45,80	0,76	98,02	1,03	14,77	0,97	11,87	0,79
30. dk	65,76	0,95	100,03	1,00	21,90	1,18	17,56	0,90
60. dk	88,39	1,43	99,89	0,23	32,21	0,60	27,75	0,42
90. dk	95,24	0,94	99,99	0,26	43,05	0,54	37,21	0,59
120. dk	97,27	0,89	99,77	0,24	52,22	0,73	44,49	1,60
3. sa	97,70	0,90	99,91	0,21	61,66	1,47	52,44	1,21
4. sa	97,39	0,97	100,21	0,47	67,40	1,26	61,11	1,17
6. sa	-	-	-	-	76,98	1,01	69,70	1,18
8. sa	-	-	-	-	82,38	0,83	76,93	0,80
12. sa	97,88	0,89	100,53	0,81	86,76	0,61	83,65	0,74
24. sa	-	-	-	-	89,72	0,54	88,85	1,24
36. sa	-	-	-	-	90,56	0,61	91,83	1,28
48. sa	-	-	-	-	90,10	1,06	92,55	1,12



**Şekil 5.8.** İn vitro salım profili

**Tablo 5.23.** *İn vitro* salım profilinin matematiksel modellere uyumu

Formülasyon	Değerlendirme	Model		
		Sıfıncı Derece	Birinci Derece	Higuchi
EP15.5	r <sup>2</sup>	-0,67786	0,48876	0,47502
	k	2,82371	0,10370	18,82162
	AIC	153,20067	135,37407	135,77195
EPF16.5	r <sup>2</sup>	-0,27480	0,71580	0,66710
	k	2,80900	0,10700	18,27300
	AIC	149,51970	127,00500	129,38070
EP15.5		Hixon-Crowell	Baker Lonsdale	Korsmeyer-Peppas
	r <sup>2</sup>	0,02453	0,72788	0,83307
	k	0,26551	0,00949	40,07328
	AIC	140,80928	125,91526	120,58539
EPF16.5	r <sup>2</sup>	0,53340	0,75850	0,84130
	k	0,02500	0,00709	26,23213
	AIC	134,44230	124,56363	120,26843

#### 5.2.4. *İn situ* jel formülasyonunun kararlılığı

##### 5.2.4.1. Fiziksel görünüş

Kararlılık çalışması için 4 °C ve 25 °C sıcaklıkta 30, 60 ve 90 gün saklanan formülasyonların Bölüm 5.2.3.1.'de bahsedilen fiziksel görünüşle aynı fiziksel görünüşe sahip olduğu belirlenmiştir. 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar ise opak beyaz koloidal süspansiyon görünümü almıştır.

##### 5.2.4.2. Jelleşme sıcaklığı

###### 5.2.4.2.1. 30. gün

Kararlılık çalışmasının 30. gününde formülasyonların jelleşme sıcaklığı aşağıda gösterilmiştir.

#### 4 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar

4 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonların jelleşme sıcaklığı Tablo 5.24'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.24.** Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (4 °C)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
			-: Tamamen Akışkan						½: Visköz				1: Jel			

#### 25 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar

25 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme sıcaklığı Tablo 5.25'te verilmiştir.

**Tablo 5.25.** Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (25 °C)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
			-: Tamamen Akışkan						½: Visköz				1: Jel			

#### 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar

40 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme sıcaklığı Tablo 5.26'da sunulmuştur.

**Tablo 5.26.** Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (40 °C)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	½	1	1	1	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
			-: Tamamen Akışkan						½: Visköz				1: Jel			

#### 5.2.4.2.2. 60. gün

Kararlılık çalışmasının 60. gününde formülasyonların jelleşme sıcaklığı aşağıda gösterilmiştir.

#### 4 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar

4 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme sıcaklığı Tablo 5.27'de verilmiştir.

**Tablo 5.27.** Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (4 °C)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
			-: Tamamen Akışkan						½: Visköz				1: Jel			

#### 25 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar

25 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme sıcaklığı Tablo 5.28’de sunulmuştur.

**Tablo 5.28.** Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (25 °C)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
			-: Tamamen Akışkan						½: Visköz				1: Jel			

#### 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar

40 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme sıcaklığı Tablo 5.29’da gösterilmiştir.

**Tablo 5.29.** Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (40 °C)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	1	1	1	1	1
			-: Tamamen Akışkan						½: Visköz				1: Jel			

#### 5.2.4.2.3. 90. gün

Kararlılık çalışmasının 60. gününde formülasyonların jelleşme sıcaklığı aşağıda sunulmuştur.

#### 4 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar

4 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme sıcaklığı Tablo 5.30’da verilmiştir.

**Tablo 5.30.** Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (4 °C)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
	-: Tamamen Akışkan						½: Visköz						1: Jel			

#### 25 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar

25 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme sıcaklığı Tablo 5.31’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.31.** Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (25 °C)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1
	-: Tamamen Akışkan						½: Visköz						1: Jel			

#### 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar

40 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme kapasitesi Tablo 5.32’de verilmiştir.

**Tablo 5.32.** Kararlılık çalışması yapılan formülasyonların jelleşme sıcaklığı (40 °C)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
EP15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1	1
EPF16.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	1	1	1	1	1
	-: Tamamen Akışkan						½: Visköz						1: Jel			

#### 5.2.4.3. Jelleşme kapasitesi

##### 5.2.4.3.1. 90. gün

#### 4 °C sıcaklıkta kararlılığa bırakılan formülasyonlar

4 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme kapasitesi Tablo 5.33’te gösterilmiştir.

**Tablo 5.33.** *Formülasyonların jelleşme kapasitesi*

<b>Formülasyon</b>	<b>Jelleşme Kapasitesi</b>
<b>EP15.5</b>	+++
<b>EPF16.5</b>	+++

#### **25 °C sıcaklıkta kararlılığa bırakılan formülasyonlar**

25 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme kapasitesi Tablo 5.34'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.34.** *Formülasyonların jelleşme kapasitesi*

<b>Formülasyon</b>	<b>Jelleşme Kapasitesi</b>
<b>EP15.5</b>	+++
<b>EPF16.5</b>	+++

#### **40 °C sıcaklıkta kararlılığa bırakılan formülasyonlar**

40 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların jelleşme kapasitesi Tablo 5.35'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.35.** *Formülasyonların jelleşme kapasitesi*

<b>Formülasyon</b>	<b>Jelleşme Kapasitesi</b>
<b>EP15.5</b>	+++
<b>EPF16.5</b>	+++

#### **5.2.4.4. Şişme**

##### **5.2.4.4.1. 90. gün**

#### **4 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar**

4 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların şişme oranı Tablo 5.36'da gösterilmiştir.

**Tablo 5.36.** *İn situ* jel formülasyonlarının şişme oranı (n=3)

Zaman (saat)	Şişme Oranı (% ± SH)	
	EP15.5	EPF16.5
0,5	46,0895 ± 0,3636	65,4360 ± 0,2731
1	88,0789 ± 0,2482	95,2927 ± 0,6941
2	99,3376 ± 0,3391	108,2624 ± 0,4058
3	108,3862 ± 0,3504	124,2685 ± 1,1323
4	116,3770 ± 0,7413	142,0161 ± 1,2787
8	124,0405 ± 0,7861	169,4253 ± 0,4424
12	138,2147 ± 1,0856	193,4425 ± 1,0484
24	152,0244 ± 0,4605	220,5393 ± 1,0726

**25 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar**

25 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların şişme oranı Tablo 5.37’de sunulmuştur.

**Tablo 5.37.** *İn situ* jel formülasyonlarının şişme oranı (n=3)

Zaman (saat)	Şişme Oranı (% ± SH)	
	EP15.5	EPF16.5
0,5	48,3426 ± 0,6985	66,4945 ± 0,6224
1	86,6886 ± 0,2670	92,2631 ± 0,7202
2	100,4601 ± 0,8993	108,4408 ± 0,3280
3	112,1014 ± 0,7696	131,6858 ± 0,9005
4	119,6374 ± 0,7775	150,1086 ± 1,3980
8	120,2118 ± 0,7792	159,1822 ± 0,4711
12	138,0810 ± 1,3866	191,3116 ± 1,0897
24	152,7156 ± 0,4714	222,4081 ± 1,3540

**40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonlar**

40 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların şişme oranı Tablo 5.38’de verilmiştir.

**Tablo 5.38.** *İn Situ jel formülasyonlarının şişme oranı (n=3)*

Zaman (saat)	Şişme Oranı (% ± SH)	
	EP15.5	EPF16.5
0,5	46,7297 ± 0,5510	66,4988 ± 0,6650
1	87,0695 ± 0,6576	91,1580 ± 0,8317
2	100,7299 ± 1,0058	110,0570 ± 1,2338
3	117,8913 ± 0,8964	143,9121 ± 1,5788
4	126,6007 ± 0,6048	163,9343 ± 1,1678
8	136,8235 ± 1,1868	174,2148 ± 1,1834
12	139,1999 ± 1,0326	192,7726 ± 0,7596
24	156,9521 ± 0,7532	230,9684 ± 0,4128

#### 5.2.4.5. pH ölçümü

##### 5.2.4.5.1. 30. gün

4 °C, 25 °C ve 40 °C sıcaklıkta kararlılığı incelenen formülasyonların 30. gündeki pH değeri Tablo 5.39’da gösterilmiştir.

**Tablo 5.39.** *Formülasyonların sıcaklığa bağlı pH değeri (n=3)*

Kararlılık Koşulu	pH değeri ± SH								
	4 °C			25 °C			40 °C		
Formülasyon	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C
EP15.5	10,493	10,020	9,470	10,437	9,987	9,447	10,400	9,970	9,450
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,007	0,000	0,006	0,009	0,003	0,007	0,006	0,000	0,000
EPF16.5	9,597	9,057	8,707	9,587	9,037	8,680	9,553	9,017	8,630
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,003	0,009	0,003	0,003	0,003	0,006	0,009	0,003	0,012

##### 5.2.4.5.2. 60. gün

4 °C, 25 °C ve 40 °C sıcaklıklarda kararlılığı incelenen formülasyonların 60. gündeki pH değeri Tablo 5.40’ta sunulmuştur.

**Tablo 5.40.** Formülasyonların sıcaklığa bağlı pH değeri (n=3)

Kararlılık Koşulu	pH değeri ± SH								
	4 °C			25 °C			40 °C		
Formülasyon	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C
EP15.5	10,517	10,087	9,540	10,487	9,930	9,517	10,417	9,987	9,450
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,003	0,009	0,000	0,009	0,000	0,003	0,003	0,009	0,000
EPF16.5	9,533	9,013	8,690	9,517	8,997	8,640	9,477	8,983	8,603
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,009	0,003	0,000	0,003	0,003	0,010	0,003	0,009	0,003

#### 5.2.4.5.3. 90. gün

4 °C, 25 °C ve 40 °C sıcaklıklarda kararlılığı incelenen formülasyonların 90. gündeki pH değeri Tablo 5.41’de verilmiştir.

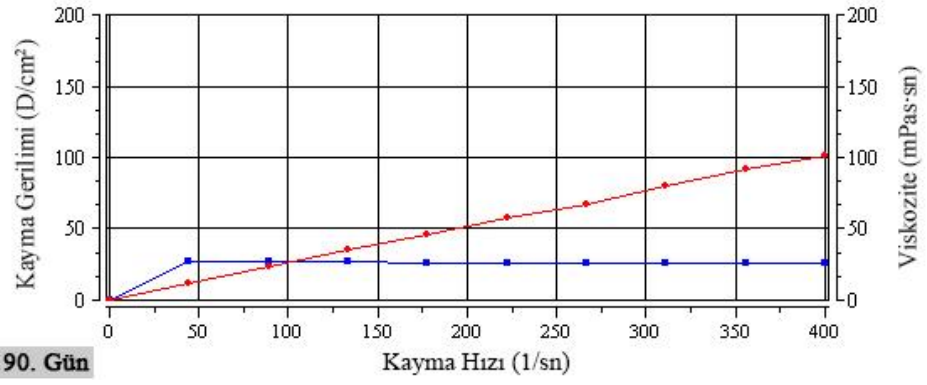
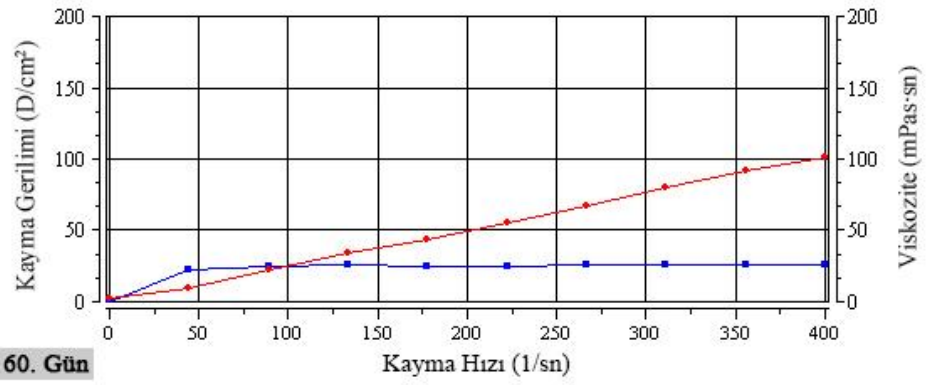
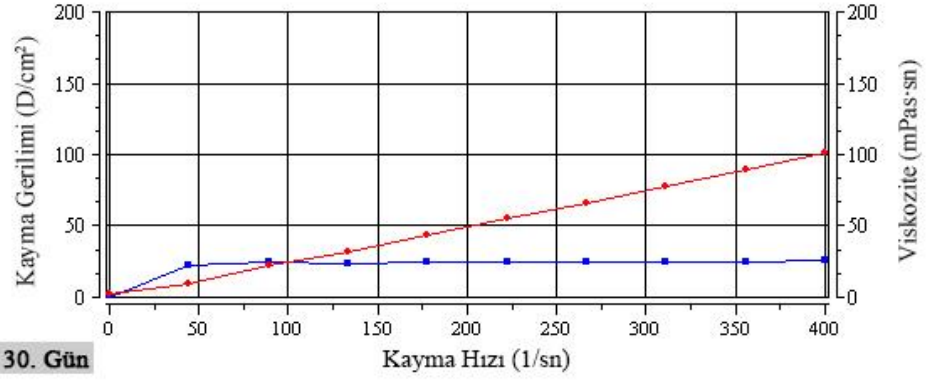
**Tablo 5.41.** Formülasyonların sıcaklığa bağlı pH değeri (n=3)

Kararlılık Koşulu	pH değeri ± SH								
	4 °C			25 °C			40 °C		
Formülasyon	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C
EP15.5	10,497	10,020	9,470	10,513	10,037	9,473	10,437	10,050	9,407
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,007	0,000	0,006	0,003	0,003	0,009	0,003	0,000	0,003
EPF16.5	9,420	9,133	8,703	9,520	9,037	8,740	9,543	8,007	8,693
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,006	0,012	0,003	0,006	0,009	0,006	0,003	0,009	0,003

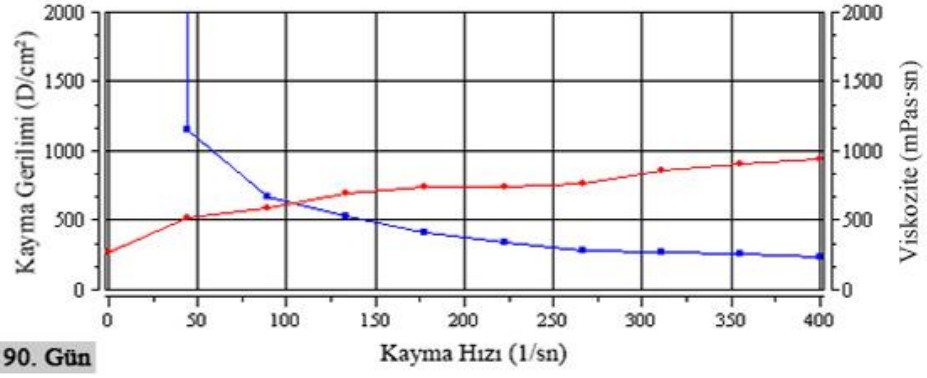
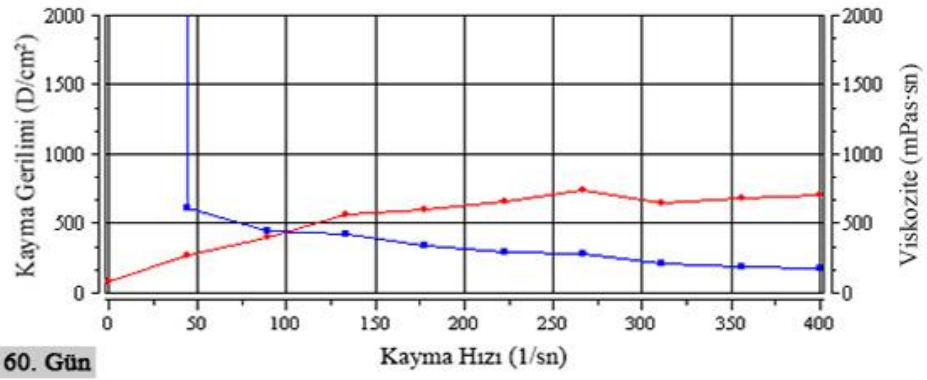
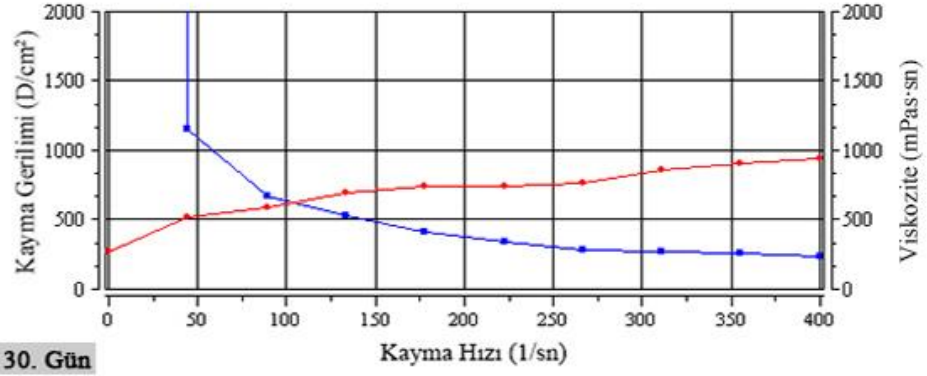
#### 5.2.4.6. Reolojik davranış

##### 5.2.4.6.1. 4 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonların reolojik davranışı

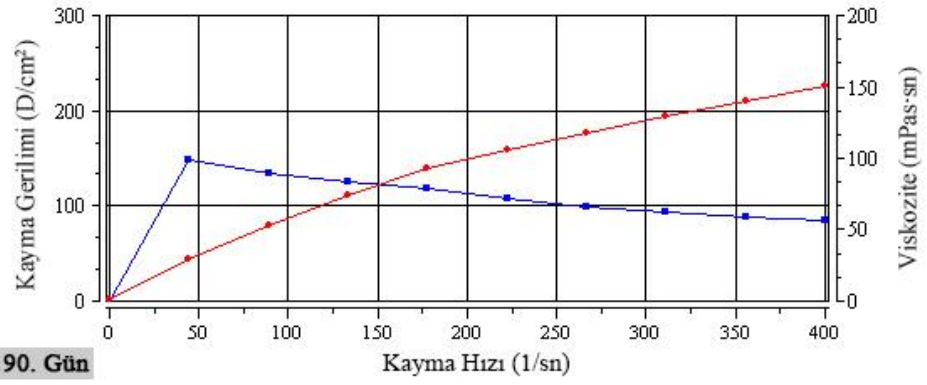
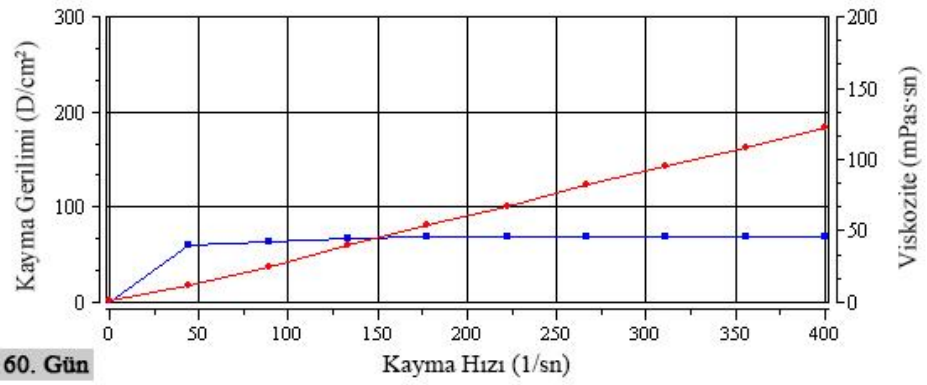
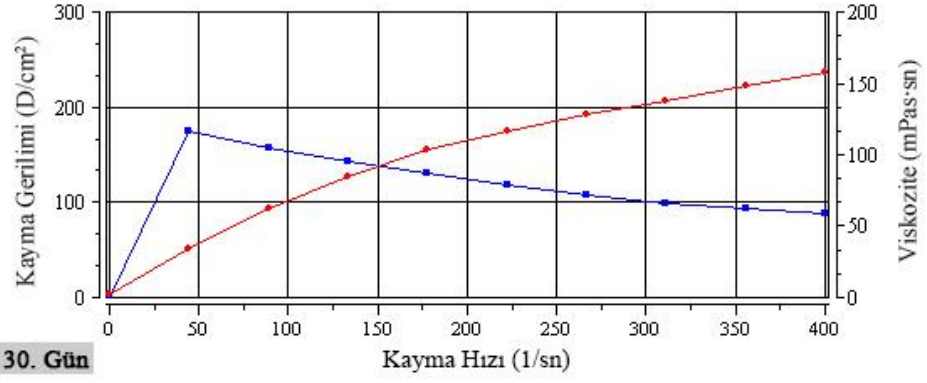
EP15.5 ve EPF16.5 formülasyonlarının reolojik davranışı 4 °C sıcaklıkta yapılan kararlılık çalışması kapsamında incelenmiştir. EP15.5 kodlu formülasyonun 30., 60. ve 90. günlerde 25 °C’deki reogramı Şekil 5.9’da, 37 °C’deki reogramı ise Şekil 5.10’da gösterilmiştir. EPF16.5 kodlu formülasyonun 30., 60. ve 90. günlerde 25 °C’deki reogramı Şekil 5.11’de, 37 °C’deki reogramı ise Şekil 5.12’de sunulmuştur.



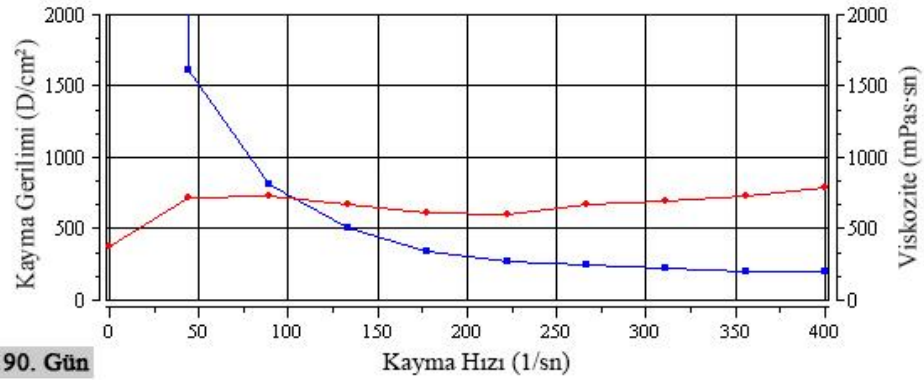
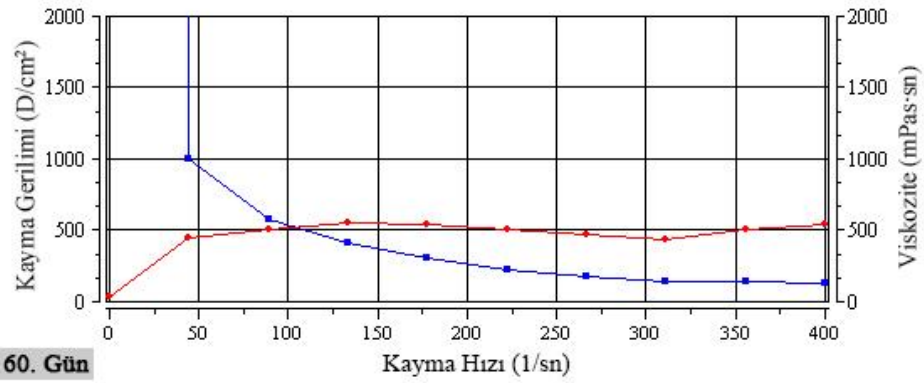
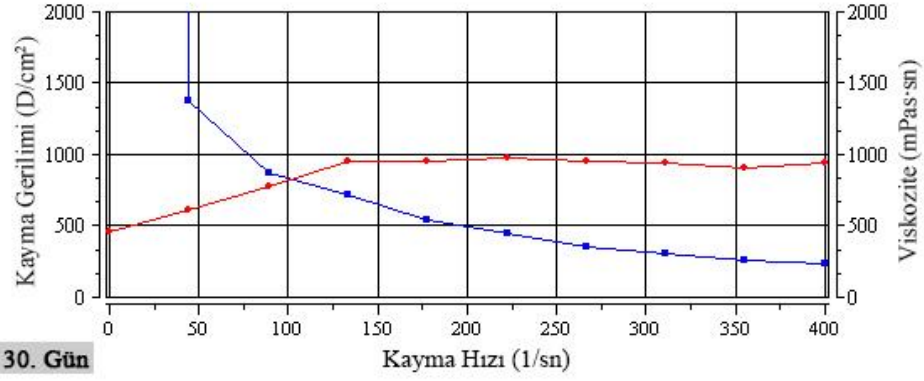
Şekil 5.9. 4 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 25 °C'deki reogramı



Şekil 5.10. 4 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 37 °C'deki reogramı



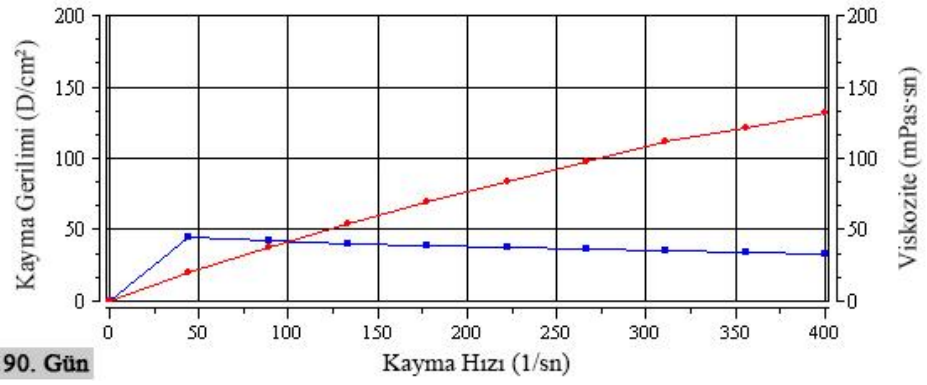
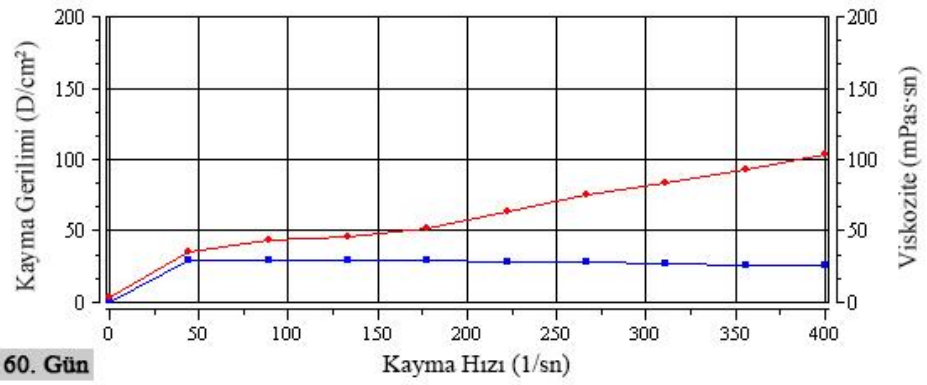
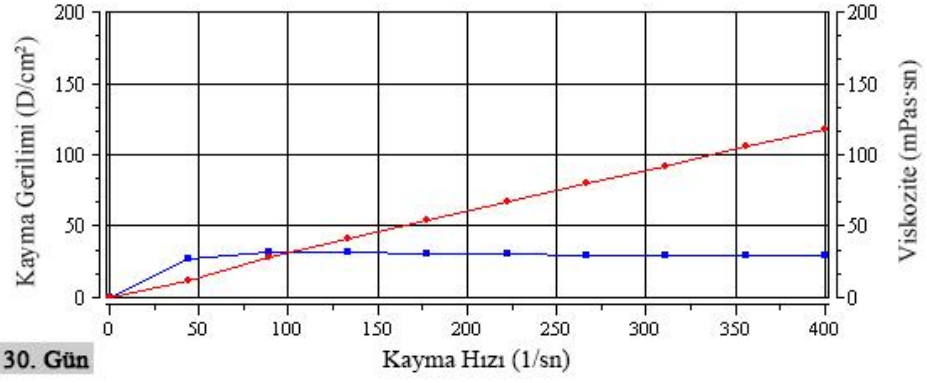
Şekil 5.11. 4 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 25 °C'deki reogramı



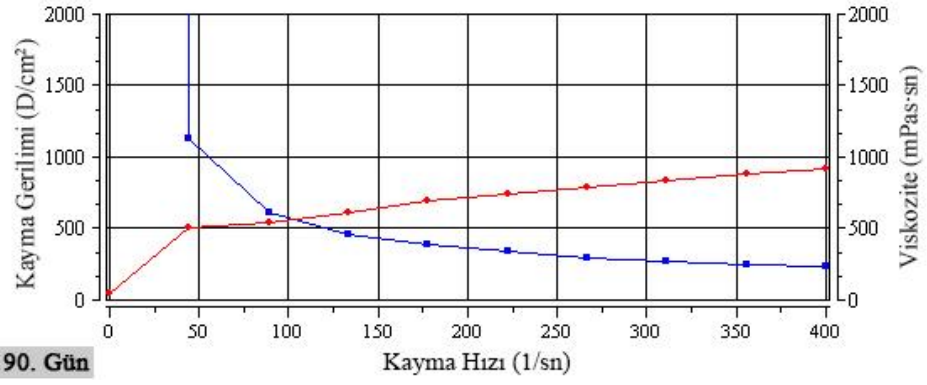
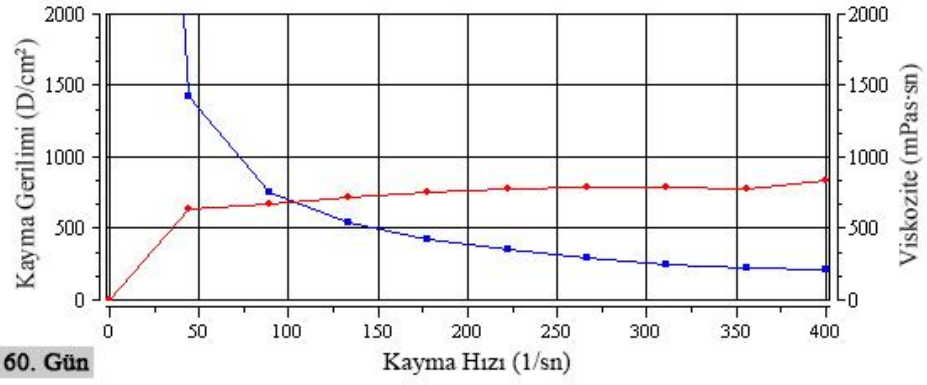
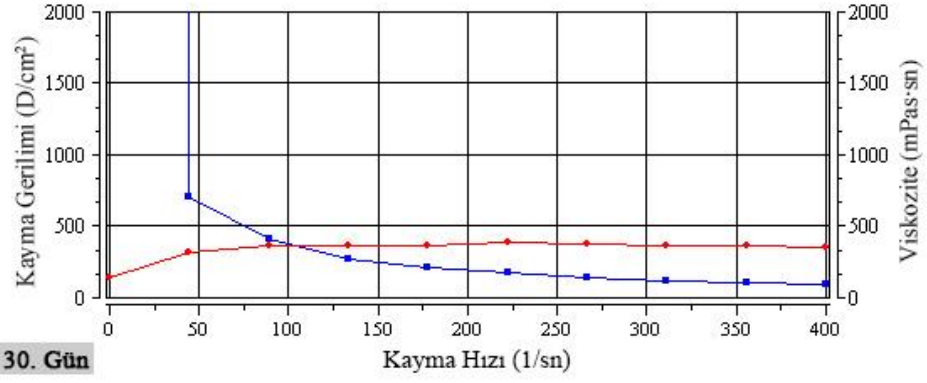
Şekil 5.12. 4 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 37 °C'deki reogramı

#### 5.2.4.6.2. 25 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonların reolojik davranışı

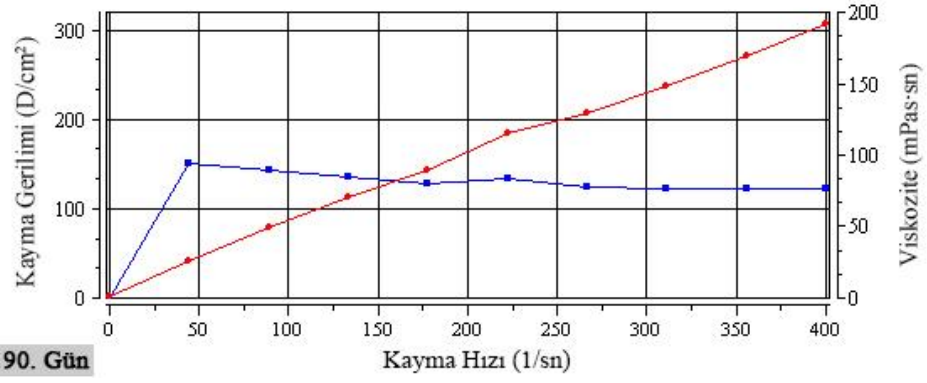
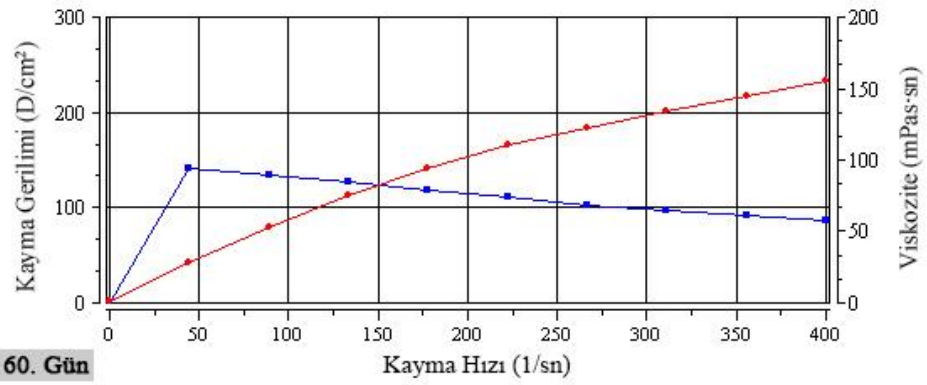
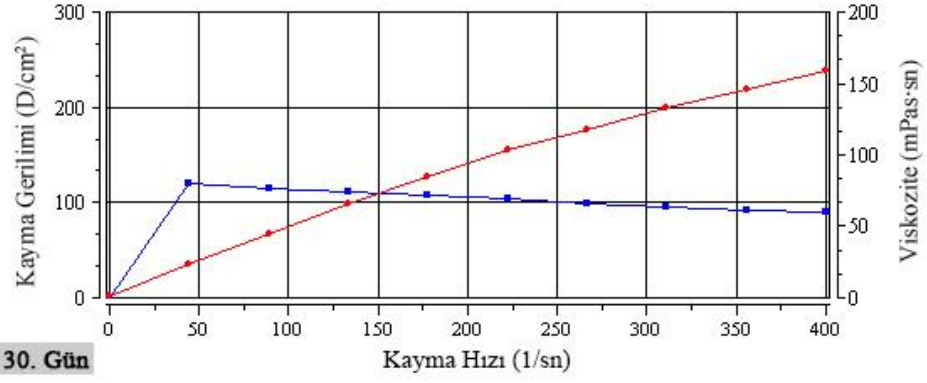
EP15.5 ve EPF16.5 formülasyonlarının reolojik davranışı 25 °C sıcaklıkta yapılan kararlılık çalışması kapsamında incelenmiştir. EP15.5 formülasyonunun 30., 60. ve 90. günlerde 25 °C'deki reogramı Şekil 5.13'te ve 37 °C'deki reogramı Şekil 5.14'te sunulmuştur. EPF16.5 kodlu formülasyonunun 30., 60. ve 90. günlerde 25 °C'deki reogramı Şekil 5.15'te, 37 °C'deki reogramı ise Şekil 5.16'da verilmiştir.



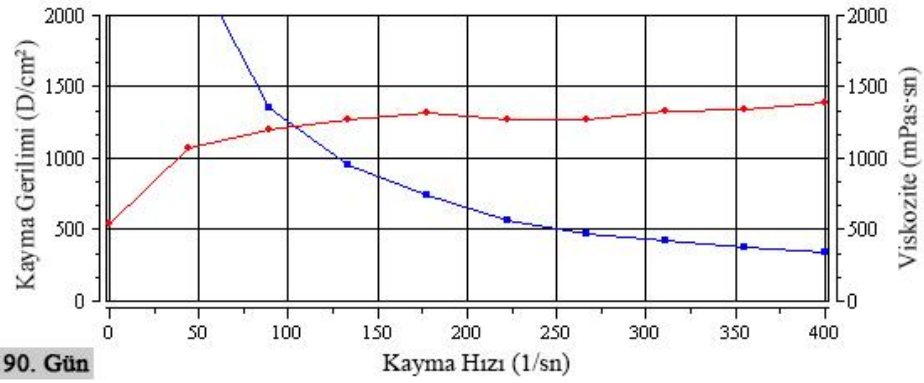
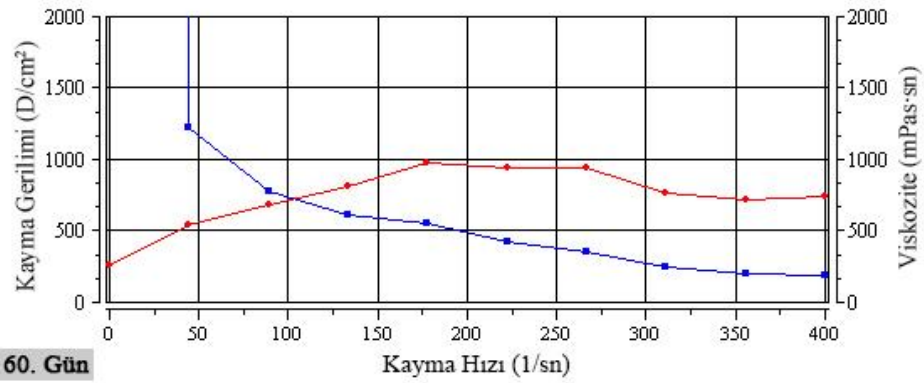
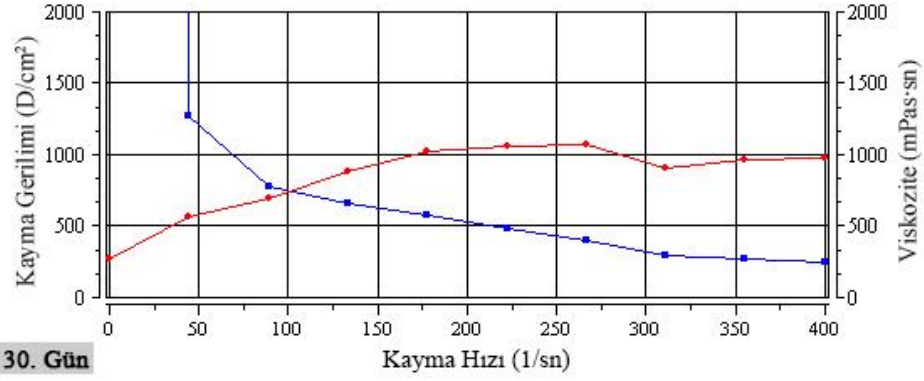
Şekil 5.13. 25 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 25 °C'deki reogramı



Şekil 5.14. 25 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonununun 37 °C'deki reogramı



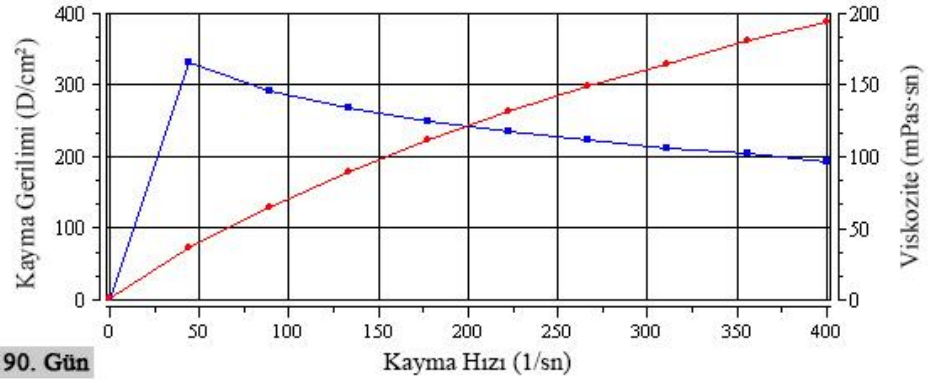
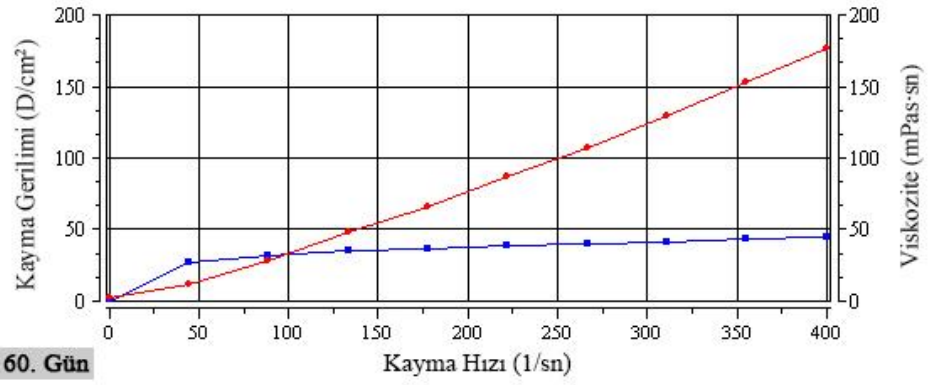
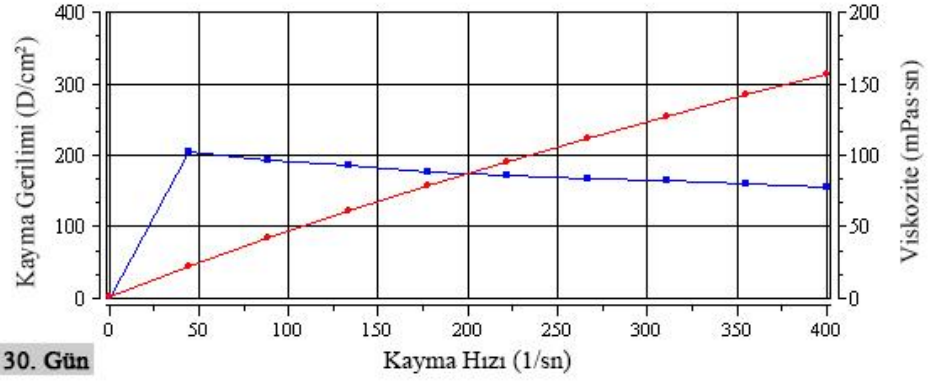
Şekil 5.15. 25 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 25 °C'deki reogramı



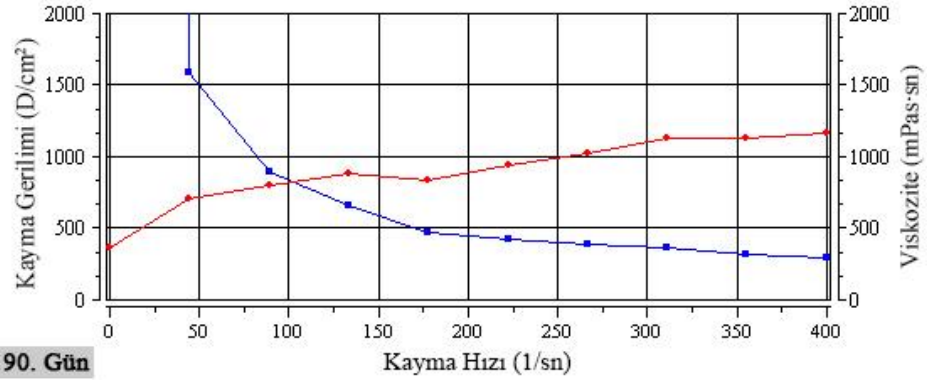
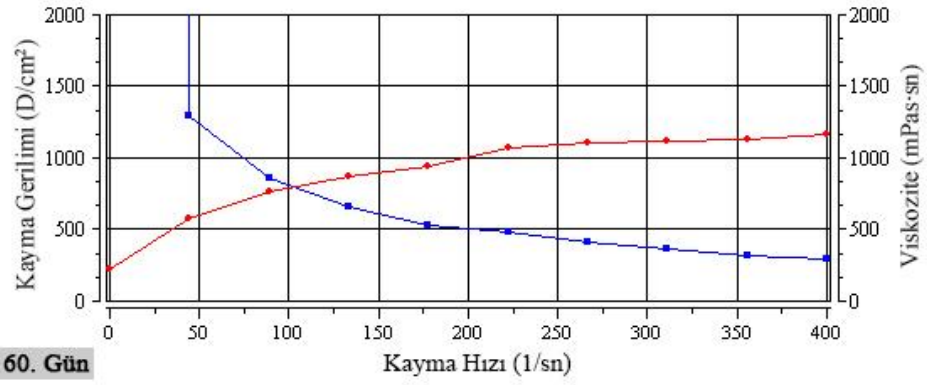
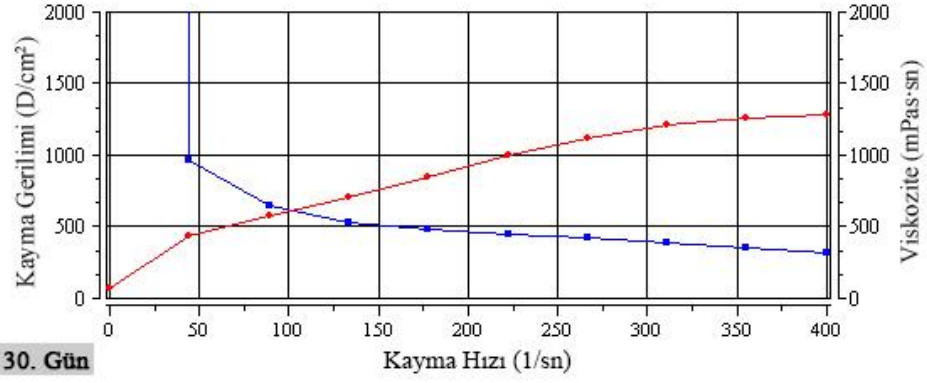
Şekil 5.16. 25 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 37 °C'deki reogramı

#### 5.2.4.6.3. 40 °C sıcaklıkta saklanan formülasyonların reolojik davranışı

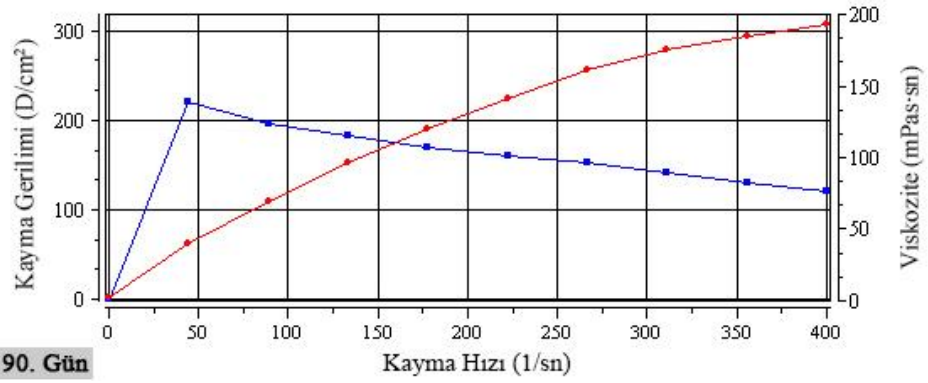
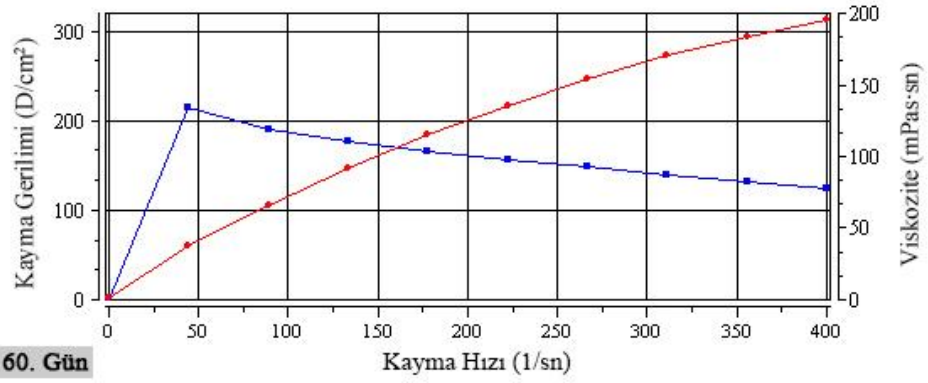
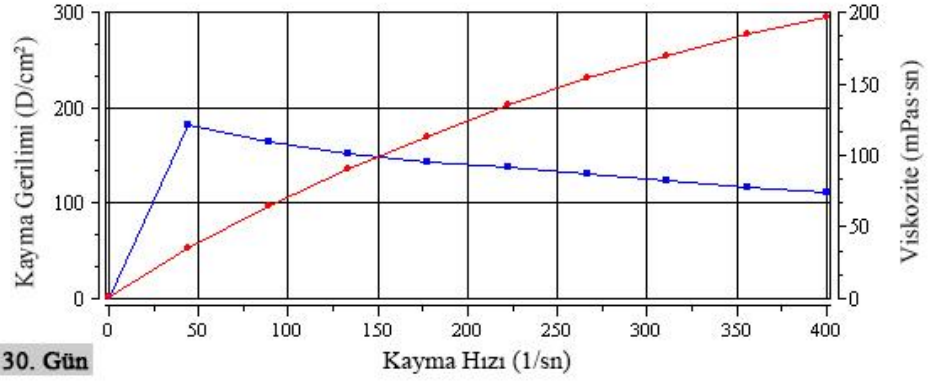
EP15.5 ve EPF16.5 formülasyonlarının reolojik davranışı 40 °C sıcaklıkta yapılan kararlılık çalışması kapsamında incelenmiştir. EP15.5 kodlu formülasyonun 30., 60. ve 90. günlerde 25 °C'deki reogramı Şekil 5.17'de ve 37 °C'deki reogramı Şekil 5.18'de gösterilmiştir. EPF16.5 kodlu formülasyonun 30., 60. ve 90. günlerde 25 °C'deki reogramı Şekil 5.19'da, 37 °C'deki reogramı ise Şekil 5.20'de gösterilmiştir.



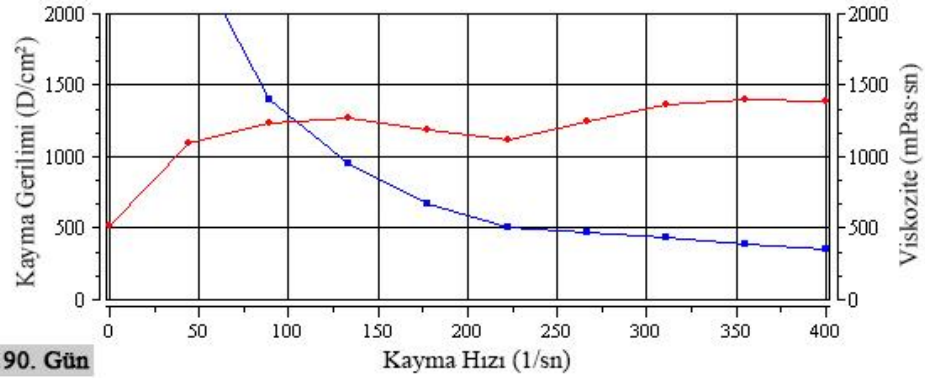
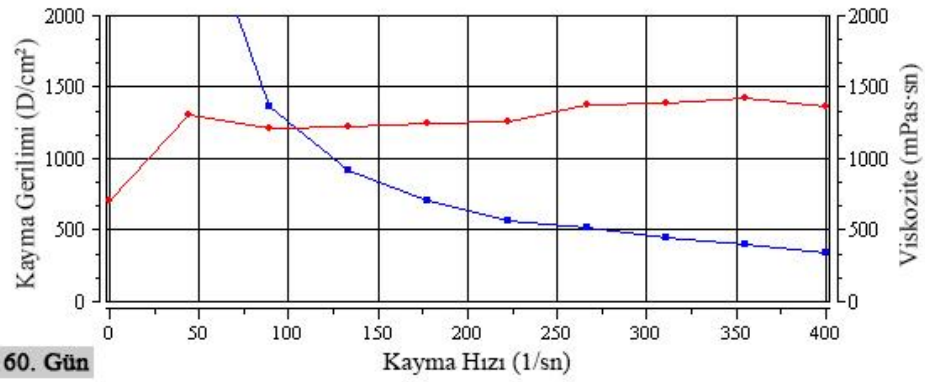
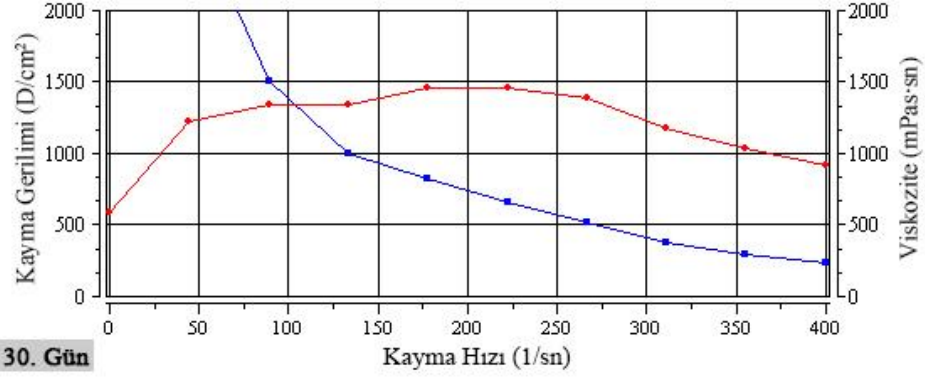
Şekil 5.17. 40 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 25 °C'deki reogramı



Şekil 5.18. 40 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EP15.5 formülasyonunun 37 °C'deki reogramı



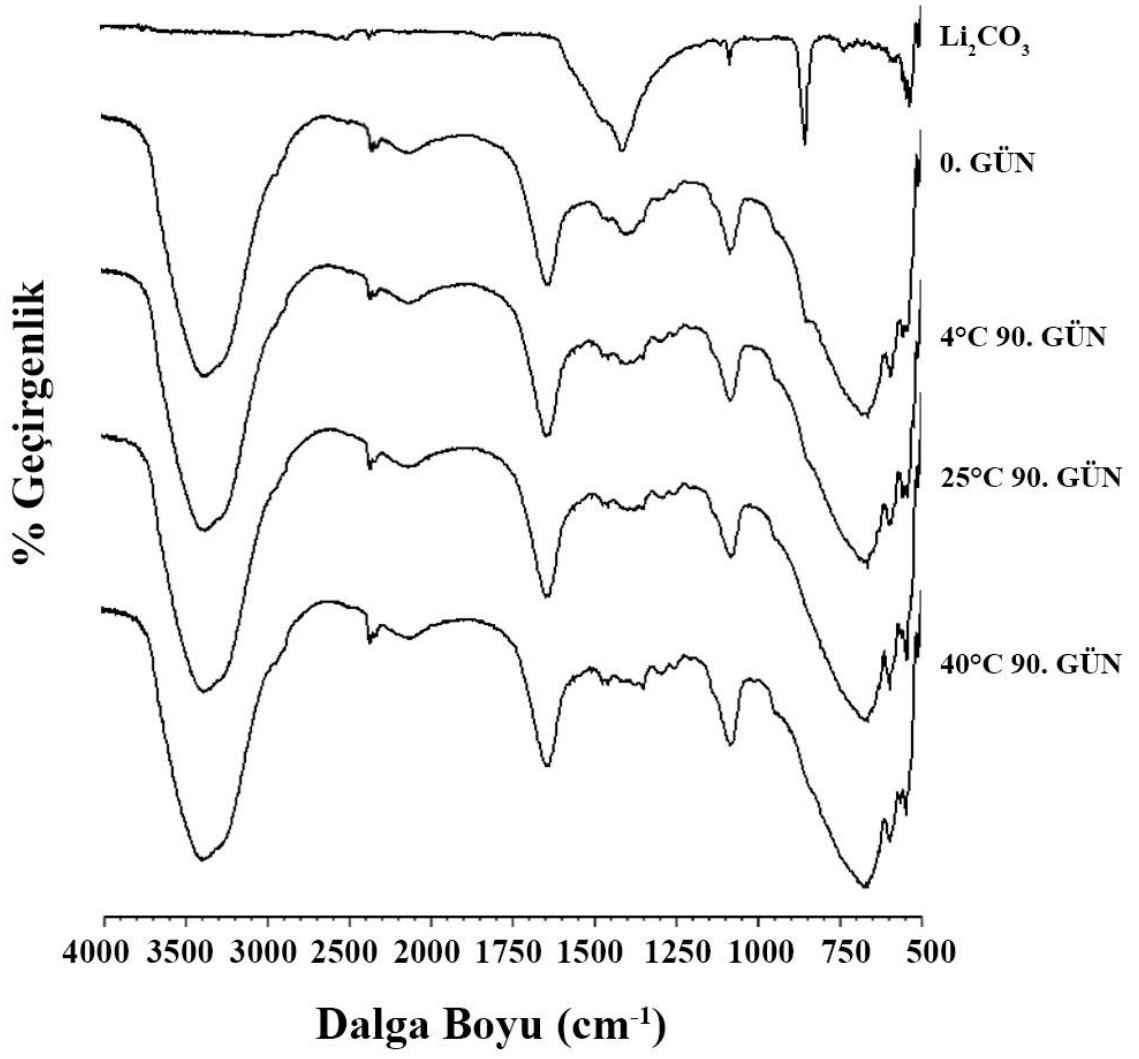
Şekil 5.19. 40 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 25 °C'deki reogramı



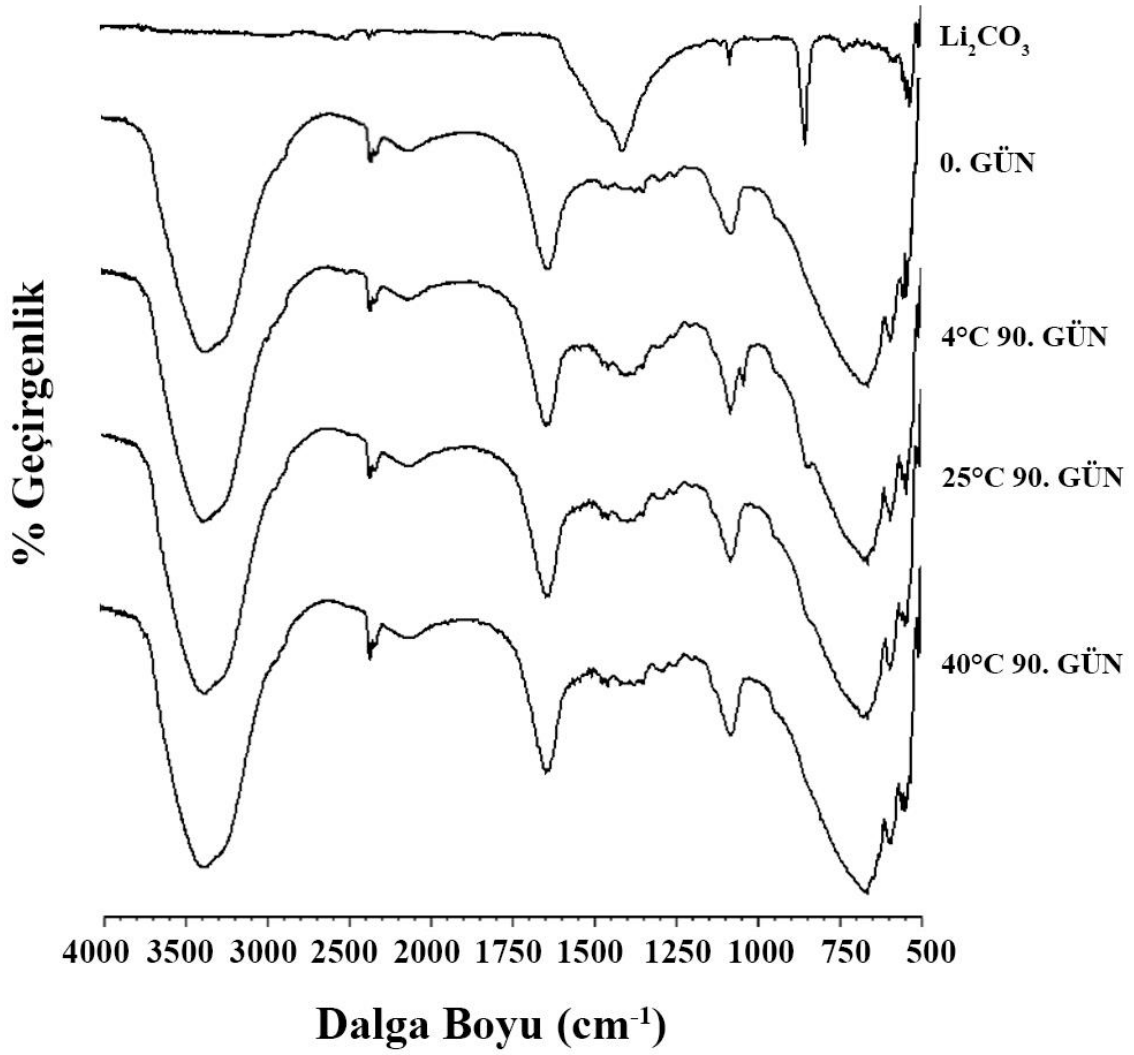
Şekil 5.20. 40 °C'de 30, 60 ve 90 gün saklanan EPF16.5 formülasyonunun 37 °C'deki reogramı

#### 5.2.4.7. Infrared (FTIR) profili

4 °C, 25 °C ve 40 °C sıcaklıkta saklanan EP15.5 kodlu formülasyonun 90. gündeki FTIR profili Şekil 5.21'de, EP15.5 kodlu formülasyonun 90. gündeki FTIR profili Şekil 5.22'de gösterilmiştir.



Şekil 5.21. EP15.5 formülasyonunun 90. gündeki FTIR spektrumu



Şekil 5.22. EPF16.5 formülasyonunun 90. gündeki FTIR spektrumu

#### 5.2.4.8. Etkin madde miktar tayini

25 °C, 4 °C ve 40 °C sıcaklıkta saklanan EP15.5 ve EPF16.5 formülasyonlarının 30., 60. ve 90. günlerde valide edilmiş Atomik Absorpsiyon Spektrometresi yöntemi kullanılarak yapılan miktar tayini ve yüzde geri kazanım değerleri sırasıyla Tablo 5.42'de ve Tablo 5.43'te sunulmuştur.

**Tablo 5.42.** EP15.5 formülasyonunda etkin madde miktarı (yüzde geri kazanım)

Zaman	Saklama Koşulu		
	4 °C	25 °C	40 °C
30. gün	100,5136	99,5978	100,9014
60. gün	100,5728	100,7883	100,6806
90. gün	100,0288	100,0180	99,9211
Ortalama	100,3718	100,1348	100,5011
STD Sapma	0,2985	0,6038	0,5143
Bağlıl STD Sapma	0,2974	0,6030	0,5117

**Tablo 5.43.** EPF16.5 formülasyonunda etkin madde miktarı (yüzde geri kazanım)

Zaman	Saklama Koşulu		
	4 °C	25 °C	40 °C
30. gün	99,9210	100,4059	100,4274
60. gün	100,3304	100,5729	100,5729
90. gün	100,6268	100,0558	100,6214
Ortalama	100,2928	100,3448	100,5406
STD Sapma	0,3543	0,2639	0,1009
Bağlıl STD Sapma	0,3533	0,2630	0,1004

#### 5.2.4.9. Birleştirilmiş kararlılık sonuçları

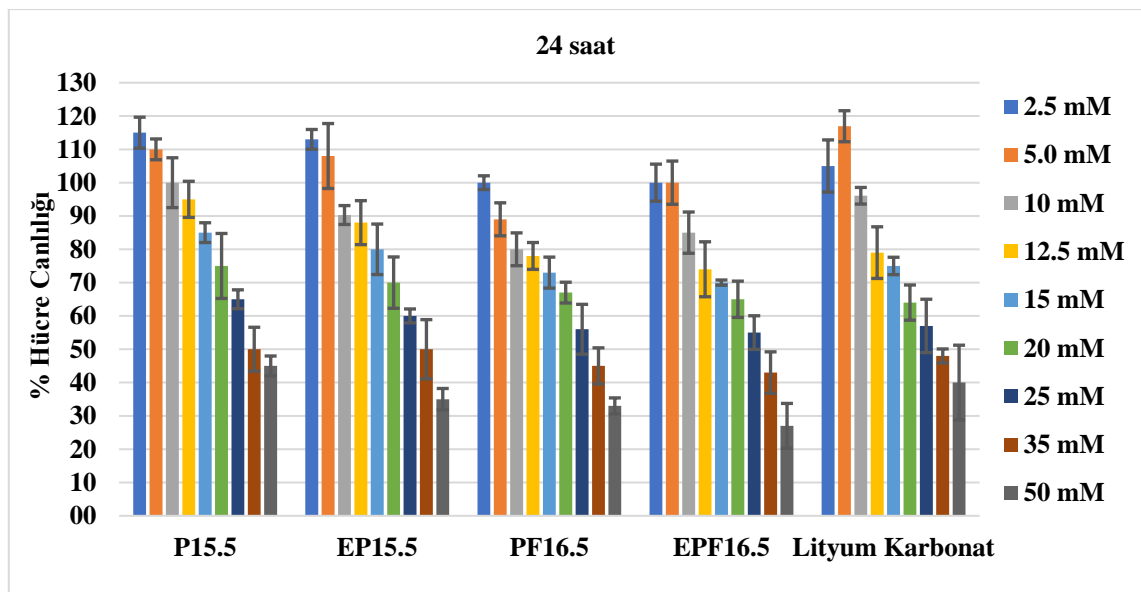
Yapılan kararlılık çalışması sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 5.44.'te gösterilmiştir.

Tablo 5.44. Kararlılık çalışmasının sonuçları

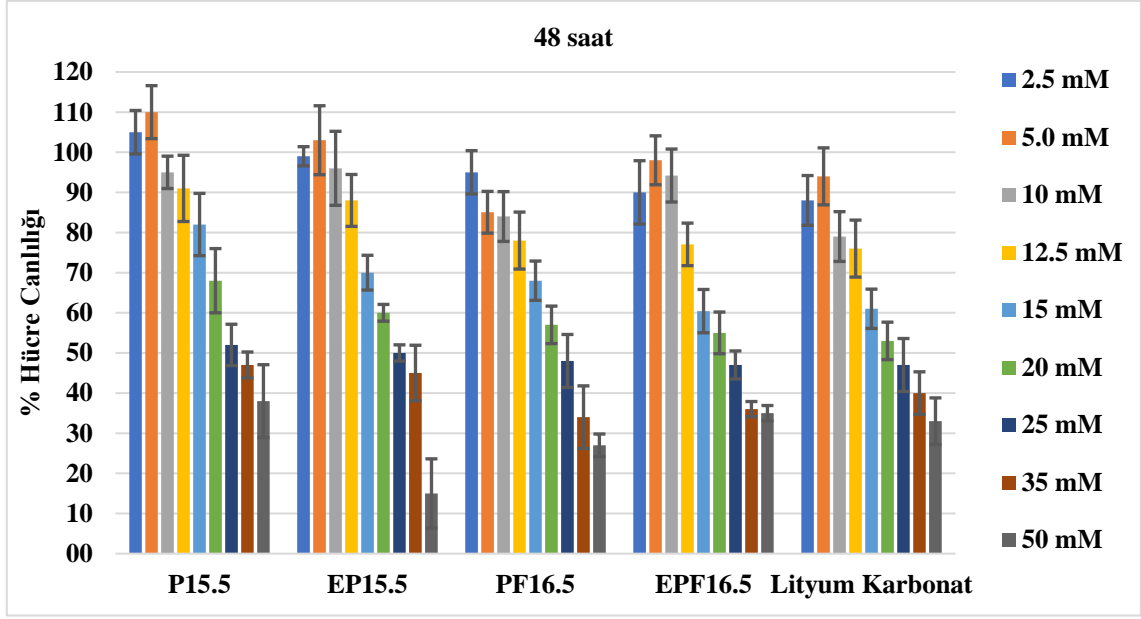
Çalışma	Formülasyonlar					
	EP15.5			EPF16.5		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
Fiziksel Görünüş	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok
Jelleşme Sıcaklığı	~37 °C	~37 °C	~36 °C	~37 °C	~37 °C	~37 °C
Jelleşme Kap.	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Şişme (24. saat)	152,0244 ± 0,4605	152,7156 ± 0,4714	156,9521 ± 0,7532	220,5393 ± 1,0726	222,4081 ± 1,3540	230,9684 ± 0,4128
pH	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok
Reolojik Davranış	Newton - Psödoplastik	Newton - Psödoplastik	Newton - Psödoplastik	Newton - Psödoplastik	Newton - Psödoplastik	Newton - Psödoplastik
FTIR	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok	Değişim yok
Miktar Tayini	Geri kazanım % ±2	Geri kazanım % ±2	Geri kazanım % ±2	Geri kazanım % ±2	Geri kazanım % ±2	Geri kazanım % ±2

### 5.2.5. Sitotoksosite

Bölüm 4.3’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen test sonucunda elde edilen saf etkin maddeye ve formülasyonlara ait 24. ve 48. saatteki hücre canlılığı yüzdesi sırasıyla Şekil 5.23 ve 5.24’te sunulmuştur. IC<sub>50</sub> değerleri de Tablo 5.44’te gösterilmiştir.



Şekil 5.23. 24 saat sonunda formülasyonların gösterdiği yüzde hücre canlılığı



Şekil 5.24. 48 saat sonunda formülasyonların gösterdiği yüzde hücre canlılığı

Şekil 5.23 ve Şekil 5.24'te görüldüğü üzere 24. ve 48. saat sonunda tüm formülasyonlar yaklaşık 10 mM'ın (0,75 mg/mL) altındaki derişimde %80'in üstünde hücre canlılığı göstermiştir. Lityum ise tek başına en düşük dozlarda (2,5 ve 5,0 mM) %100'ün üzerinde hücre canlılığı gösterirken, 24. saatte 12,5 mM ve 48. saatte 10 mM derişimin üzerinde hücre canlılığında düşme göstermiştir.

Tablo 5.44. Etkin madde ve formülasyonlara ait  $IC_{50}$  değerleri

Formülasyon	$IC_{50}$ (mM)	
	24 saat	48 saat
Lityum Karbonat	28,5	23,5
P15.5	35	26
EP15.5	35	25
PF16.5	28	24
EPF16.5	27,5	23,5

## 6. TARTIŞMA

Tezin bu bölümünde hazırlanan miktar tayini için geliştirilen analitik yöntem, formülasyonların fizikokimyasal özelliklerine ve *in vitro* çalışmalara ait bulgular tartışılacaktır.

### 6.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışması

Tez kapsamında yapılan tüm miktar tayini çalışması AAAS yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikli nedeni Amerikan Farmakopesi'nde lityum analizi için AAAS'nin önerilmesidir (USP 24). Metal iyonlarının miktar tayininde AAAS'nin yüksek duyarlılığa sahip olması, hızlı sonuç vermesi, kolay uygulanabilmesi ve uzun yıllardır kullanılan bir yöntem olması üstünlük taşımaktadır. Her metalin spesifik dalga boyuna sahip olması çevreden gelen girişimlerin en az düzeyde olmasını sağlamaktadır. AAAS'nin laboratuvar çalışmalarında çevresel girişimlerin yöntemin doğruluğu üzerine nadiren etki ettiği görülmüştür (Robinson, 1960).

Etkin maddenin sinyal verdiği dalga boyu, kullanılan atomik absorpsiyon spektrometresinin veri tabanında önerilen üç farklı dalga boyundan lityum karbonat'ın en yüksek absorban değerini verdiği 671 nm dalga boyu olarak seçilmiştir.

Lityum karbonat miktar tayini yapılacak olan saf su (pH 7,0) ve fosfat tamponu (pH 7,4) ortamları için ayrı ayrı analitik yöntem validasyonu çalışması yapılmış, böylece kullanılan yöntemin her iki matriste de etkin madde miktar tayini için geçerli olduğu kanıtlanmıştır.

Validasyon çalışması kapsamında saf su ve fosfat tamponu matrisi için çizilen regresyon eğrilerinin determinasyon katsayısı ( $r^2$ ) her ikisi için de 0,9999 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç yöntemin doğrusallığını kanıtlamaktadır. Yine saf su ve fosfat tamponu matrisleri için üç farklı derişimde yapılan doğruluk çalışmalarında, geri eldeedilebilirliğin her iki matris için de  $\pm$  %2 sınırları içerisinde olduğu görülmüştür. Buna ek olarak üç farklı günde üç farklı derişim ile yapılan kesinlik çalışmasında varyasyon katsayısının %2'nin altında olması yöntemin kesinliğini kanıtlamıştır (ICH Q2/R1, 2005).

Yöntemin duyarlılığını kanıtlamak için elde edilen doğrusallık eğrisinden yola çıkılarak LoD ve LoQ değerleri hesaplanmış ve analiz çalışmasının yapıldığı doğrusallık sınırlarının bu değerlerin üstünde olduğu gösterilmiştir.

## 6.2. *In Situ* Jel Formülasyon Çalışması

Blok kopolimer olarak bilinen Poloxamer® ve Pluronic® farklı oranlarda polietilen oksit ve polipropilen oksit içeren ve 1100-14000 arasında molekül ağırlığına sahip polimerlerdir (Ruel-Gariepy ve Leroux, 2004; Almeida vd., 2014). Tavşan üzerinde yapılan bir çalışmada intramüsküler Poloksamer® 238 ve 407 uygulanmasının ardından oluşan toksisitenin fıstık yağı gibi geleneksel intramüsküler taşıyıcının yarattığı toksisite ile karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir (Johnston ve Miller, 1985). Enjeksiyona uygun özelliğe sahip ve nontoksik olması Poloxamer® 407 ve Pluronic® F127 polimerlerinin bu çalışmada kullanılması için üstünlük yaratmıştır.

Oishi (2004) tarafından yapılan çalışmada erkek sıçanlara 8 hafta boyunca 10-1000 mg/kg/gün doz aralığındaki 10 farklı derişimde metil paraben diyeti uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda üreme organı ağırlığı, spermatozoit sayısı, plazma luteinleştirici hormon (LH), folikül uyarıcı hormon (FSH) veya testosteron derişimi üzerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir. İlaçların içerebileceği maksimum metil paraben miktarı %0,2 olarak belirlenmiştir (EMA, 2015). Gupta vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada, Pluronic® F-127 ve kitosan ile hazırlanan oküler *in situ* jelleşen sistemdeki bakteriyel üremeyi engellemek için koruyucu olarak %0,1 metil paraben kullanılmıştır. Belirtilen bu özellikler göz önüne alınarak bu çalışmada da koruyucu madde olarak %0,1 oranda metil paraben seçimine karar verilmiştir.

Sıcaklığa duyarlı *in situ* jelleşen polimer olan blok kopolimerde jelleşme olayı agregasyon sayısı ve sıcaklıkla indüklenen misel simetrisinde değişim ile gerçekleşir. Misel simetrisindeki değişim yani jelleşmenin gerçekleştiği sıcaklık çözeltideki polimer derişimine bağlıdır. Düşük polimer derişimi sıcaklık 37 °C'ye ulaştığında jelleşmenin oluşmasını engellerken, yüksek polimer derişimi çok daha düşük sıcaklıkta jelleşmeye neden olur. Bu durum hem maliyet hem de toksik etkiyi artırır (He, Kim ve Lee, 2008; Güven, 2016). Ayrıca parenteral kullanılacak preparat için enjektörün tıkanmasına da yol açabilir. Bu nedenle tez kapsamında formülasyon geliştirme çalışması yapılırken ~37 °C'de jelleşen en düşük polimer derişimi hesaplanmıştır. Çevresel koşuldaki değişimin

kas içi uygulama bölgesinde etki yaratmayacağı bilirse de deri altı bölgede yaratacağı ısı farklılığı göz önünde bulundurularak jelleşme sıcaklığı 37 °C'nin hemen altında, 36-37 °C arasında tutulmuştur. Formülasyon geliştirme çalışması kapsamında hazırlanan etkin maddesiz formülasyonlara etkin madde eklenmesinin ardından formülasyon seçiminden önce jelleşme sıcaklığını tekrar ~37 °C'ye ayarlayabilmek için ufak aralıklarda polimer derişimi değiştirilmiş ve jelleşme sıcaklığı tekrar kontrol edilmiştir.

Jelleşme sıcaklığının tayininde test tüpü eğme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde normalde akışkan olan sıvının sıcaklığı kademeli olarak artırılır ve jel geçişini gösterdiği sıcaklık akışkan özelliğini kaybettiği nokta olarak seçilir (Daniel, Dammet ve Guenet, 1994; Chou ve Hong, 2004). Formülasyonların 37 °C'de jel halinde olduğu ve jel geçişinin 36-37 °C görülmüştür. Bu durum formülasyonların vücut sıcaklığında jelleşen en düşük polimer derişimine sahip olduğunun kanıtıdır.

*In situ* jelleşen sistemlerin sterilizasyonunda steril membrandan süzme yöntemi sıkça kullanılan bir yöntemdir (Mohan, Kandukuri ve Allenki, 2009; Güven, 2016). Ancak süspansiyonun süzülerek sterilizasyonu olanaksız olduğundan formülasyonlar hazırlanırken etkin madde ve koruyucu madde karıştırma işleminin son 1 saatinde eklenmiştir. Böylece hazır olan polimer çözeltisi steril hale getirildikten sonra yine aseptik ortamda etkin madde ve koruyucu maddenin eklenebileceği gösterilmiştir.

Enjeksiyonluk dozaj şeklinin sahip olduğu pH değeri preparatın fizikokimyasal özelliği, hasta konforu ve doku sağlığı açısından önemlidir. İdeal olarak vücut sıvılarının pH derecesi olan 7,4'e yakın pH'ya sahip formülasyon hazırlanması daha uygundur (Zırh Gürsoy, 2004). Bu çalışmada kullanılan etkin maddenin karbonat tuzu şeklinde olması süspansiyon ortamında çözünen eser miktarda etkin maddenin ortamı bazik hale getirmesine neden olmaktadır. Lityum karbonat'ın suda çözünürlüğü sıcaklık ile ters orantılıdır; sıcaklık arttıkça süspansiyondaki karbonat miktarı azaldığından pH değeri 7,4'e yaklaşmaktadır. Hazırlanan EP15.5 ve EPF16.5 formülasyonun farklı sıcaklıktaki pH değeri Bölüm 5.2.2.4'te gösterilmiştir. Ward vd. (2012) tarafından insan gönüllüler üzerinde yapılan çalışmada, insan albümini içeren pH 7,4 ve pH 10 değerine sahip çözeltiler subkütan olarak enjekte edilmiştir. Dokuda oluşan enflamasyon pH'dan bağımsız olarak tüm enjeksiyonluk preparatta aynı oranda görülmüştür. Uygulama hızının yüksek olması durumunda hasta rahatsızlığı açısından pH değerleri arasında

anlamli fark olmamıştır. Yavaş uygulamada ise pH 10'a sahip preparatın pH 7,4'e göre daha yüksek rahatsızlığa neden olduğu görülmüştür. Ancak bu rahatsızlığın 1 ile 6 arasında değerlendirilmesi istendiğinde pH 7,4'te  $0,4 \pm 0,2$ , pH 10,0'da ise  $1,1 \pm 0,2$  olduğu belirlendiğinden rahatsızlık derecesinin hafif olduğuna karar verilmiştir. Buna ek olarak Simamora vd., (1995) tarafından tavşanlarda yapılan çalışmada pH değişiminin flebit insidansına etkisi incelenmiş ve 3,0-11,0 arasındaki formülasyon pH'sının *i.v.* uygulamada flebit insidansına katkıda bulunmadığı gösterilmiştir. Bu tez içerisinde hazırlanan formülasyonların pH değerleri, vücut sıvılarının pH değerlerinden daha yüksektir. Ancak bu fark hasta rahatsızlığı ve doku sağlığı açısından dezavantaj yaratacak kadar büyük değildir. Bu durum formülasyonların hazırlanmasında tampon çözeltilerin kullanılmasına ihtiyaç olmadığını göstermiştir. Böylece bu çözeltilerin sebep olacağı toksik etkilerin önüne geçilmiştir.

Jelleşme kapasitesi, *in situ* jelleşen sistem olarak kullanılmaya uygun formülasyonu tanımlamak amacıyla jelleşme özelliği açısından yapılan değerlendirmedir (Srividya, Cardoza ve Amin, 2001; Abraham vd., 2009). Tez kapsamında hazırlanan formülasyonlarda jelleşmenin 37 °C sıcaklıkta hemen oluşup uzun süre kalması amaçlanan kontrollü salım açısından istenilen bir özelliktir. Jel özelliğini hızla kaybeden formülasyonların içerdiği etkin maddenin salımını uzatması olanaksızdır. Aynı şekilde çok yoğun jel oluşturan formülasyonlardan etkin madde gerekli zamanda salınamayabilir. Hazırladığımız formülasyonların 37 °C'de hızla jel oluşturması ve jel özelliğini uzun süre sürdürmesi kontrollü salım yapabilme yeteneğine sahip olduğunun bir göstergesidir.

Barnes, Hutton ve Walter (1989), *Newton* modeli akış gösteren sıvının kayma hızına karşı kayma gerilimi doğrusal artış gösterirken *Newton*-olmayan modelde kayma hızına karşı kayma geriliminin parabolik artış gösterdiğini belirtmiştir. Aynı zamanda *Newton* akış gösteren sıvının viskozite değerleri kayma hızından bağımsız olarak her noktada aynıdır. Oysa *Newton*-olmayan akış başlığı altında tanımlanan plastik ve psödoplastik akış gösteren sıvıda viskozite kayma hızıyla azalırken, dilatan akışta viskozite kayma hızıyla artar (Hekimoğlu, 2004). Hazırlanan formülasyonların 25 °C'de çizilen kayma hızına karşı kayma gerilimi ve viskozite grafikleri incelendiğinde, sabit kalan viskozite ve doğrusal olarak artış gösteren kayma gerilimi süspansiyonların oda sıcaklığında *Newton* akış gösterdiğini kanıtlamıştır. 37 °C'de çizilen grafiklerde ise kayma gerilimi belirli bir değerden başlayarak parabolik olarak hızlı artış göstermiş ve

sonrasında bu artış azalarak ilerlemiştir; ayrıca formülasyonların viskozite değeri kayma hızına bağlı olarak azalmıştır. Kayma hızının sıfıra en yakın olduğu noktada kayma geriliminin yüksek olması psödoplastik akış gösterdiğini kanıtlamaktadır. Bu durum formülasyonların oda sıcaklığında akışkan bir süspansiyon halindeyken vücut içerisinde katı jel halini aldığını gösteren diğer bir parametredir. Bunun yanısıra enjeksiyon yapılmadan önce kayma hızına karşı viskozitenin sabit olması, uygulayan profesyonelin uygulama hızına göre formülasyonun farklı akış göstermemesi ve şırınganın tıkanmaması açısından önemlidir.

Formülasyonların FTIR grafiği incelendiğinde 2500-3700  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında suya ait büyük bir pik görülmektedir. 2300-2400  $\text{cm}^{-1}$  aralığında ise koruyucu madde olarak kullanılan metil paraben'in piki yer almıştır. Saf lityum karbonat ile formülasyonlar karşılaştırıldığında saf lityum karbonat'a ait bağların gösterdiği pik değerleri formülasyona yüklenmesinin ardından maskelenmiştir. Bu durum yüzey etkin madde özelliğine sahip olan sıcaklığa duyarlı *in situ* jel oluşturan Poloxamer® 407 ve Pluronic® F127 polimerlerinin misel yapı oluşturarak lityum kristallerinin etrafını sardığını düşündürmektedir.

Parçacık boyutu analizi yöntemlerinden birisi de mikroskobik incelemedir. Pol vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada parçacık boyutu analizi yöntemleri karşılaştırılmıştır. TEM ile yapılan analiz sonucunda özellikle TEM'in parçacık karakterizasyonu açısından yararlı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, diğer yöntemlerin aksine mikroskobik yöntemler örnek hazırlama şekline etkilenmez. Bunun yanında sakınca olarak TEM'in üç boyutlu analiz yapamaması, parçacıkların yalnızca genişliğine göre boyutunu ölçebilmesi ve dolayısıyla yüksekliği genişliğinden daha fazla olan parçacıkları ihmal ederek ölçüm yapabildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada mikroskop olarak SEM kullanılmıştır. SEM 3 boyutlu analiz yapabileceği için yüksekliği genişliğinden fazla olduğu anlaşılan parçacıklar ölçüm dışında bırakılarak bağıl boyut hatası en düşük düzeye indirilebilmiştir. Yapılan parçacık analizinde parçacıkların ortalama boyutunun parenteral uygulanan süspansiyonlar için geçerli olan 60  $\mu\text{m}$  sınırının altında olduğu gösterilmiştir.

### 6.3. Salım

Tez kapsamında hazırlanan EP15.5 ve EPF16.5 formülasyonunun ve karşılaştırma amacıyla ülkemizde bulunan tek lityum karbonat preparatı Lithuril® ile lityum karbonat süspansiyonunun salım çalışması yapılmıştır. Lithuril®'in oral kullanılması nedeniyle salım ortamı ve yöntemi diğer çalışmalardan farklı olarak mide ortamını temsil edecek şekilde farmakopeye uygun olarak hazırlanmıştır (USP 24).

Lithuril® ve hazırlanan formülasyonların salım özelliğini karşılaştırmak için salım ortamı subkütan ve intramüsküler uygulamayı temsil edecek şekilde bölüm 4.2.3.7'de anlatılan yöntem ile hazırlanmıştır. Elde edilen veriler zamana karşı yüzde kümülatif miktar olarak değerlendirilmiş ve matematiksel uyum gösterilmiştir. Matematiksel modellere uyumun belirlenmesi için DDSolver programı kullanılmıştır (Zhang vd., 2010).

Matematiksel modele uyumun karşılaştırılmasında üç farklı kriter kullanılmıştır: Akaike bilgi kriteri (AIC), hız sabiti (k) ve regresyon analizinin determinasyon katsayısı ( $r^2$ ). Formülasyonlara ait salım profillerinin en yüksek uyum gösterdiği matematiksel model belirlenirken en yüksek k değeri, en düşük AIC değeri ve 1'e en yakın olan  $r^2$  değeri kullanılmıştır (Öztürk, 2017). Yapılan değerlendirmenin ardından hazırlanan her iki formülasyonun da Korsmeyer-Peppas modeline uygun şekilde salım yaptığı saptanmıştır. Salım profilinin Korsmeyer-Peppas matematiksel modeline uygun olması taşıyıcı sistemden etkin madde salımının kontrollü olarak gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Determinasyon katsayısı doğrusal model için uyum ölçüsü olarak ortaya atılmış katsayıdır (Draper and Smith, 2014). Regresyon analizinde determinasyon katsayısının hesaplanması için iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi korelasyon katsayısının (r) karesini almaktır. Bir diğer yöntem ise çoklu regresyon analizinde sıkça kullanılan Eşitlik 6.1'dir. DDSolver programında doğrusal regresyon ve çoklu doğrusal regresyon yöntemlerinin ikisi de kullanılmaktadır (Zhang vd., 2010). Çoklu doğrusal regresyon analizinde aşağıdaki formülden yola çıkılarak  $r^2$  değerinin eksi değer alabileceği görülmektedir.

$$R^2 = 1 - \sum_i \frac{(y_i - f_i)^2}{(y_i - \bar{y})^2}$$

(6.1)

Tablo 5.23 incelendiğinde, formülasyonların salımının sıfırcı derece kinetiğinde değerlendirilmesi amacıyla yapılan regresyon analizinde determinasyon katsayısı eksi değer almıştır. Determinasyon katsayısının eksi değer alması sıfır olarak kabul edilebilir (Özdamar, 1997; Öztürk, 2017).

#### 6.4. Kararlılık

Kararlılık çalışması Uluslararası Harmonizasyon Konseyi'nde belirlenen sıcaklık ve nem kriterlerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda her 30 günde bir fiziksel görünüş incelenmiş, jelleşme sıcaklığı, pH ve reolojik davranış ölçümü yapılmış ve etkin madde geri kazanımı hesaplanmıştır. Kararlılık çalışmasının 90. gününde bu analizlere ek olarak şişme çalışması ve FTIR analizi yapılmıştır.

Kararlılık çalışması sonunda formülasyonların fiziksel görünüşünde herhangi bir değişim olmamıştır.

Jelleşme sıcaklığı analizinde EPF16.5 formülasyonunun tüm kararlılık koşullarında 90 gün boyunca jelleşme sıcaklığında herhangi bir değişime uğramadığı saptanmıştır. Ancak 40 °C sıcaklıkta saklanan EP15.5 formülasyonunun 2. ve 3. ayda 1° daha düşük sıcaklıkta jelleşmeye başladığı belirlenmiştir. Bu durum formülasyonun vücut sıcaklığında olması gerekenden daha katı bir jel oluşturabileceğini ve salım özelliğinin değişebileceğini düşündürmüştür.

Formülasyonlar Bölüm 5.2.4.3'te görüldüğü gibi 90. günde yapılan jelleşme kapasitesi analizinde 0. zamana oranla herhangi bir değişiklik göstermemiştir. Bu durum formülasyonların jelleşme kapasitesi açısından tüm kararlılık koşullarında kararlı kaldığını kanıtlamaktadır.

Her iki formülasyonun pH değeri kararlılık süresi boyunca yapılan ölçümler arasında değişkenlik göstermiş ancak fark anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Formülasyonların reolojik davranışının izlenmesi sonucunda her iki formülasyonun da kararlılık süresi boyunca 25 °C sıcaklıkta yapılan ölçümde 0. zamanda görüldüğü gibi kayma hızına karşı doğrusal olarak artan kayma gerilimi ve sabit viskozite gösterdiği belirlenmiştir. 37 °C sıcaklıkta yapılan ölçümde ise iki formülasyonun da kayma hızına karşı parabolik olarak önce hızla sonrasında yavaşlayan artış gösteren kayma gerilimi ve azalan viskozite değerine sahip olduğu görülmüştür. Sıfıra en yakın kayma hızında kayma geriliminin yüksek olması akışın psödoplastik akışa uygun olduğunu göstermektedir. Formülasyonlar 25 °C ve 40 °C sıcaklıkta 0. zamanda da benzer akış özelliği göstermiştir.

Kararlılığın 90. gününde etkin maddenin formülasyonlardan geri kazanımı hesaplanmış ve formülasyonlardan etkin madde geri kazanımının her üç kararlılık koşulunda da  $\pm$  %2 sınırı içinde kaldığı bulunmuştur. Bu sonuç etkin maddenin formülasyon içinde kararlılık çalışması boyunca bozunmadan kaldığını kanıtlamaktadır.

## 6.5. Sitotoksosite

Çeşitli etken maddenin (kimyasal ilaç, tıbbi materyal) hücre büyümesini, üremesini ve morfolojik etkisini *in vitro* olarak gözlemlemek için kullanılan sitotoksosite testleri biyolojik değerlendirme ve tarama testi yapan en önemli yöntemlerden birisidir (Kunzmann vd., 2011; Soenen vd., 2012). ‘3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür’ veya metil tiyazolil tetrazolyum (MTT) deneyi olarak da bilinen mitokondriyal dehidrogenaz performans ölçümü ile hücre çoğalması kolorimetrik olarak hızlı şekilde değerlendirilebilir (Fotakis ve Timbrell, 2006). Testin prensibi suda çözünen sarı renkli boyada bulunan tetrazolyum halkasının canlı hücre mitokondrisi tarafından parçalanarak mor renkli formazan kristaline dönüşmesine dayanmaktadır. Bu kristaller dimetil sülfoksit veya diğer organik çözücüler içinde çözünür ancak suda çözünmez. Oluşan kristallerin miktarı, hücre sayısı ve canlılığı ile doğrudan ilişkilidir ve kolorimetrik değer (absorbans-optik yoğunluk) ölçümü hayatta kalan hücre ve metabolik aktivite sayısını yansıtmaktadır. MTT testi günümüzde hücre büyüme hızını ve toksisiteyi test etmek için kullanılan en yaygın yöntemdir (Li, Zhou ve Xu, 2015).

Tez kapsamında lityum karbonat içeren/içermeyen ve taşıyıcı madde olarak Poloxomer® 407 ve Pluronic® F127’nin kullanıldığı formülasyonların hücre üzerindeki etkisi MTT testi ile değerlendirilmiştir. 2,5 mM ile 50 mM arası derişimin

değerlendirildiği çalışmada lityum içermeyen formülasyonlarda IC<sub>50</sub> değeri EP15.5 için 35 mM iken EPF16.5'te bu değer 28 mM'a düşmüştür. Bunun nedeninin EPF16.5 formülasyonunda bulunan Pluronic® F127'nin Poloxamer® 407'e göre daha sitotoksik etki göstermesi olduğu düşünülmüştür. Bu durum Bölüm'ümüzde yapılan bir başka çalışmada da saptanmıştır (Güven, 2016).

Ju vd.'nin (2013) %19 oranında Poloxamer® 407 ile hazırladığı paklitaksel yüklü sıcaklığa duyarlı misel-hidrojelinde de 24 ve 48 saat sonunda hücre canlılığı en yüksek dozda (1500 µg/mL) dahi %50'nin altına düşmezken 72 saat sonunda hücre canlılığının %40'ın altına düştüğü gözlenmiştir. Oysa bu çalışmada özellikle düşük derişimde ilk 24 saatte Poloxamer® 407'nin hücre canlılığının artışına yol açtığı saptanmıştır. Bu sonuç literatürde yapılan diğer çalışmalarla uyum göstermiştir. Örneğin, Zeng vd.'nin (2015) yaptığı çalışmada %17-21 derişimdeki Poloxamer® 407'nin hücre canlılığında artışa neden olduğu rapor edilmiştir.

Pluronic® F127 kullanılarak hazırlanan 2,5 µg/mL'den 5000 µg/mL'ye kadar derişimde plüronik miseli ile yapılan çalışmada NIH-3T3 fare fibroblast hücreleri üzerinde 24 ve 48 saatlik MTT testi yapılmış ve hiçbir dozda sitotoksisite belirlenmemiştir (Arranja vd., 2014). Tez kapsamında saf Pluronic® F127 ve Poloxamer® 407 kullanılarak hazırlanan PF16.5 plasebo formülasyonda hücre canlılığı 24-48 saatte benzer dozda (yaklaşık 15 mM) düşmeye başlarken IC<sub>50</sub> değeri 24 saatte 28 mM ve 48 saatte 24 mM olarak saptanmıştır. Bu tezde görülen sitotoksisitenin formülasyonlarda kullanılan Pluronic® F127'nin derişiminin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bipolar bozukluğun tedavisi için yaygın olarak reçete edilen lityum, toksisite olasılığı ve gastrointestinal, renal, nörolojik ve endokrin yan etki göstermesi nedeniyle endişe içermektedir. Tedavi için genellikle 0,5-0,8 mM serum lityum düzeyi önerilmekle birlikte daha yüksek yan etki insidansı olasılığına karşın etkinliğin yüksek olması nedeniyle en yaygın kullanılan doz 0,8-1,2 mM arasında serum düzeyi ile sonuçlanan dozlardır. Lityum'un toksisitesi ile ilgili literatürde birbiri ile çelişkili birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin Allagui ve ark.'nın (2007) sitotoksisite değerlendirmesi için lityum varlığında 3 gün boyunca kültürlenmiş A549 hücre dizilerini kullandıkları çalışmada IC<sub>50</sub> değerini 5mM olarak saptamışlardır. Ayrıca çalışmada deney sonucunda

2mM (toksisite eşiği) ile 12 mM (letalite eşiği) arasında değişen konsantrasyonlar için doza bağımlı hücre büyümesi inhibisyonu olduğunu belirtmişlerdir. Buna karşın birkaç çalışmada lityum'un hücre çoğalması üzerine olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. MTT yöntemi kullanılan çalışmaların birinde ATX3'ü (Q84) eksprese eden hücrelerin canlılığı 2,5, 5 ve 7,5 mM derişimdeki lityum karbonat ile test edilmiştir (Lopes-Ramos vd., 2016). 48 saatlik inkübasyon sonucunda 5 mM başlangıç lityum karbonat derişimine ait hücre canlılığında rölatif artış gözlenmiştir. Doza bağımlı etki gözlenen çalışmada 5 ve 7,5 mM lityum karbonat uygulanan hücre canlılığında %17 ve %21'lik artış saptanmıştır. Buna karşılık, test edilen en düşük lityum karbonat derişiminin (2,5 mM) hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisi olmadığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlar Annexin V/PI çift boyama işleminden sonra sitometri analizi ile doğrulanmıştır.

Gavrilova vd.'nin (2016) yaptığı bir başka çalışmada MTT testi kullanılarak farklı lityum preparatlarının hepatokarsinoma-29 hücresi üzerinde yapılan çalışmada 0,00001 ile 20 mM arasındaki derişimde uygulanan doğal ve nanoboyuttaki lityum karbonat'ın hücre canlılığında doza bağlı azalmaya neden olduğu saptanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonunda doğal şeklin sitotoksitesisi 10mM'da görülürken nanoboyutlu şeklin sitotoksik etkisi 20 mM derişimde gözlenmiştir. Bu farklılık nanopartikül şeklin doğal şekle göre daha yüksek reaktif kapasiteye sahip olmasıyla açıklanmıştır. Nanoboyutlu yapı doğal lityum karbonat'ın değirmende öğütülmesiyle elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında da 5 mM derişimdeki saf lityum'un 2,5 mM'a göre hücre canlılığını 24 saatte %10 ve 48 saatte %6 arttırdığı, derişim artışı ile canlı hücre popülasyonunda azalma olduğu belirlenmiştir. Çalışmadaki IC<sub>50</sub> değerinin 24 saat için 28,5 mM ve 48 saat için 23,5 mM olduğu bulunmuştur. Lityum'un düşük derişimde sitotoksik olmadığı literatürde yapılan birçok çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da gösterilmiştir. Bu çalışmada saptanan IC<sub>50</sub> değerleri bazı kaynaklar ile uyumlu iken bazılarına göre daha yüksek çıkmıştır. Testte kullanılan hücre çeşidi ve inkübasyon süresindeki farklılığın bu sonuçta etkili olduğu düşünülmüştür. Bunun yanısıra yalnızca Poloxomer<sup>®</sup> 407 kullanılarak hazırlanan EPF15.5 formülasyonlarında saf lityum'un gösterdiği sitotoksitesiyi polimerin düşürdüğü ve hücre canlılığı üzerinde olumlu etki yarattığı belirlenmiştir. Bununla birlikte Poloxomer<sup>®</sup> 407 ve Pluronic<sup>®</sup> F127'nin birlikte kullanılarak hazırlanan PF16.5 formülasyonunun sitotoksitesisi saf lityum'un sitotoksitesisi üzerinde belirgin etki göstermemiştir. Plasebo formülasyonlar (PF15.5 ve

PF16.5) ile lityum yüklü formülasyonların (EPF15.5 ve EPF16.5) sitotoksitesi arasında belirgin farklılık gözlenmemiştir.

## 7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Lityum karbonat içeren *in situ* jelleşen sistem geliştirilen bu çalışma kapsamında, hazırlanan formülasyonların karakterizasyon, *in vitro* salım ve kararlılık çalışması gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlar piyasada bulunan Lithuril® ile aynı miktarda etkin madde içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Etkin maddenin yüklendiği *in situ* jelleşen sistem ile hedeflendiği gibi lityumun salımı uzatılmış ve Korsmeyer-Peppas matematiksel salım modeline uygun şekilde kontrollü salımı sağlanmıştır.

Formülasyonlar vücut sıcaklığında jelleşebilen minimum polimer derişimi saptanarak hazırlanmıştır.

Sıcaklığa duyarlı *in situ* jelleşen sisteme yüklenen etkin maddenin parçacık boyutu enjeksiyonluk preparatlar için belirlenen sınırlar içerisinde tutulmuştur.

Reolojik özellikleri değerlendirilen formülasyonların oda sıcaklığında *Newton* akış gösterdiği, vücut sıcaklığında ise psödoplastik akış özelliklerine sahip olduğu ve kararlılık süresi boyunca bu akış özelliklerinin değişmediği saptanmıştır.

Kararlılık çalışmaları boyunca formülasyonların tamamında pH değişimleri standart enjeksiyonluk preparatların ortaya çıkardığı patolojik endikasyonlar dışında patolojik bir durum oluşturmayacak seviyede kalmıştır. Buna ek olarak düzenli aralıklarla yapılan etkin madde miktar tayinlerinde, etkin maddenin formülasyon içerisinde kararlılığını koruduğu gösterilmiştir. Formülasyonların fiziksel görünüşlerinde bir değişiklik olmamış ve yapılan FTIR, jelleşme kapasitesi, şişme çalışmalarında formülasyonların 0. güne göre değişim göstermediği gözlenmiştir. EPF16.5 kodlu formülasyonun jelleşme sıcaklığı sonuçları kararlılığın herhangi bir zamanında veya koşulunda değişiklik göstermemiştir. Ancak EP15.5 kodlu formülasyonun jelleşme sıcaklığı 4 °C ve 25 °C sıcaklık koşulunda kararlı olsa da 40 °C sıcaklık koşulunda jelleşme sıcaklığı azalmıştır.

Sitotoksisite çalışmalarının sonucunda formülasyonların sitotoksik olmadığı ve sonuçların literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Çalışmanın sonraki aşamasında formülasyonların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin tam anlamıyla aydınlatılabilmesi için hayvan deneyleri yapılabilir.

## KAYNAKÇA

- Abraham, S., Furtado, S., Bharath, S., Basavaraj, B.V., Deveswaran, R., Madhavan, V. (2009). Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from an ion-activated *in situ* gelling system. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22 (2), 175-179.
- Ağabeyoğlu, İ. (2002). Kontrollü salımın farmakokinetik temelleri. A. Zırh Gürsoy (Ed.), *Kontrollü Salım Sistemleri* (s. 7-19). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği.
- Alda, M. (2015). Lithium in the treatment of bipolar disorder: pharmacology and pharmacogenetics. *Molecular psychiatry*, 20(6), 661.
- Allagui, M.S., Vincent, C., Gaubin, Y. and Croute, F. (2007). Lithium toxicity and expression of stress-related genes or proteins in A549 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773 (7), 1107-1115.
- Almeida, H., Amaral, M.H., Lobao, P. ve Lobo, J.M.S. (2014). *In situ* gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations. *Drug Discovery Today*, 19 (4), 400-412.
- Altıntaş, K., Oral, E.T. ve Vahip, S. (2005). İki uçlu depresyon ve tedavisi. *Düşünen Adam*, 18 (1), 48-54.
- Arranja, A., Schroder, A.P., Schmutz, M., Waton, G., Schosseler, F. and Mendes, E. (2014). Cytotoxicity and internalization of Pluronic micelles stabilized by core cross-linking. *Journal of Controlled Release*, 196, 87-95.
- Atalay, M. (1980). Enjeksiyon yolu, yeri ve tekniği. *Türk Hemşireler Dergisi*, 30 (3), 59-67.
- Barnes, H.A., Hutton, J.F. and Walter, K. (1989). *An Introduction to Rheology*. Amsterdam: Elsevier.
- Chou, C.M. and Hong, P.D. (2004). Nucleation, growth, fractal aggregation, and late-stage coarsening on structural development of polymer physical gels. *Macromolecules*, 37 (15), 5596-5606.

- Daniel, C., Dammer, C. and Guenet, J.M. (1994). On the definition of thermoreversible gels: the case of syndiotactic polystyrene. *Polymer*, 35 (19), 4243-4246.
- Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L. and Chowdhury, P. (2010) Kinetic modelling on drug release from controlled drug delivery systems. *Polish Pharmaceutical Society*, 67 (3), 217-223.
- Draper, N.R. and Smith, H. (2014). *Applied Regression Analysis*, New York: John Wiley & Sons.
- Erdal E. (1991). Hemşireler için İlaç Hazırlama ve Uygulama Rehberi (2. Baskı). Bornova: Ege Üniversitesi Basımevi.
- Eroğlu, M.Z. ve Özpoyraz, N. (2010). Bipolar bozuklukta koruyucu tedavi. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 2 (2), 206-236.
- Erős, I. (2011). Polymers and biopolymers in pharmaceutical technology. S. Kalia and L. Avérous (Eds.), In: *Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications* (s. 525-558). Canada: Scrivener Publishing LLC.
- European Medicines Agency (EMA). (2015). Reflection paper on the use of methyl- and propylparaben as excipients in human medicinal products for oral use. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), [www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2015/11/WC500196733.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/11/WC500196733.pdf) (Erişim tarihi: 20.10.2017).
- Fotakis, G. and Timbrell, J.A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160 (2), 171-177.
- Gavrilova, Y.S., Bgatova, N.P., Solov'eva, A.O., Trifonova, K.E., Lykov, A.P., Borodin, Y.I. and Konenkov, V.I. (2016). Target cells for lithium in different forms within a heterogeneous hepatocarcinoma-29 population. *Cell and Tissue Biology*, 10 (4), 284-289.
- Geçgil, Ş. (1991). *Farmasötik Teknolojiye Başlangıç*. İstanbul: Cihan Matbaacılık.

- Gönül, N. (2004). Farmasötik teknoloji- temel konular ve dozaj şekilleri. A. Zırh Gürsoy (Ed.), *Aerosol Sistemler*. (s. 409-422). İstanbul: Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri.
- Gupta, A. and Manocha, N. (2013). Formulation and evaluation of *in-situ* ophthalmic drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3 (4), 715-718.
- Gupta, H., Jain, S., Mathur, R., Mishra, P., Mishra, A.K. and Velpandian, T. (2007). Sustained ocular drug delivery from a temperature and pH triggered novel *in situ* gel system. *Drug Delivery*, 14 (8), 507-515.
- Gupta, H., Velpandian, T. and Jain, S. (2010). Ion- and pH-activated novel *in-situ* gel system for sustained ocular drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 18 (7), 499-505.
- Güven, U.M. (2016). Antihistaminik Etkili Oftalmik Kontrollü Salım Gösteren Farklı Sistemler Üzerinde Çalışmalar. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- He, C., Kim, S.W. and Lee, D.S. (2008). *In situ* gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *Journal of controlled release*, 127 (3), 189-207.
- Hekimoğlu, S. (2004). Sıvıların akış özelliği (Reoloji). A. Zırh Gürsoy (Ed.), *Farmasötik Teknoloji -Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*. (s. 15-26). İstanbul: Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri.
- Hirschfeld, R.M., Lewis, L. and Vornik, L.A. (2003). Perceptions and impact of bipolar disorder: how far have we really come? Results of the national depressive and manic-depressive association 2000 survey of individuals with bipolar disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 64 (2), 161-174.
- [http2: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lithium\\_carbonate#section=3D-Conformer](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lithium_carbonate#section=3D-Conformer)  
(Erişim tarihi: 09.04.2018)

http3: [periodic-table-of-elements.org/SOLUBILITY/lithium\\_carbonate](http://periodic-table-of-elements.org/SOLUBILITY/lithium_carbonate) (Erişim tarihi: 16.04.2018)

http4: [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lithium\\_carbonate#section=Melting-Point](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lithium_carbonate#section=Melting-Point) (Erişim tarihi: 16.04.2018)

http5: [www.albemarle-lithium.com/pdf/401135.pdf](http://www.albemarle-lithium.com/pdf/401135.pdf) (Erişim tarihi: 16.04.2018)

ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1). *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*'da sunulan bildiri. [www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf) (Erişim tarihi: 19.03.2018)

EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1. (2014). Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms. *Committee for Medicinal Products for Human Use*'da sunulan bildiri. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2014/11/WC500177884.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/11/WC500177884.pdf) (Erişim tarihi: 17.05.2018)

İnanç, N., Hatipoğlu, S., Yurt, V., Avcı, E., Albayrak, N. ve Öztürk, E. (1996). *Hemşirelik Esasları*. (2. Baskı). Ankara: Damla Matbaacılık.

Jeong, B., Kim, S.W. and Bae, Y.H. (2012). Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 154-162.

Johnston, T.P. and Miller, S.C. (1985). Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 39 (2), 83-89.

Ju, C., Sun, J., Zi, P., Jin, X., and Zhang C. (2013) Thermosensitive micelles-hydrogel hybrid system based on poloxamer 407 for localized delivery of paclitaxel, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 102 (8), 2707-2717.

Kara, K., Akarsu, S. ve Verim, S. (2013). Bipolar bozuklukta nörogörüntüleme. *Psiyatriye Güncel Yaklaşımlar*, 5 (1), 1-14.

- Karabacak, G.B. (2015). Parenteral ilaç uygulamaları. N. Sabuncu ve F.A. Ay (Editörler), *Klinik Beceriler: Sağlıkın Değerlendirilmesi, Hasta Bakım ve Takibi*. (s. 249-299). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Keck, Jr. P.E., McElroy, S.L. and Arnold, L.M. (2001). Bipolar disorder. *Medical Clinics*, 85 (3), 645-661.
- Keck, P.E., Nelson, E.B. and McElroy, S.L. (2003). Advances in the pharmacologic treatment of bipolar depression. *Biological Psychiatry*, 53 (8), 671-679.
- Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A., and Fadeel, B. (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810 (3), 361-373.
- Li, W., Zhou, J. and Xu, Y. (2015). Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, 3 (5), 617–620.
- Liu X. (2015). Biodegradable thermogelling poly(organophosphazenes) and their potential biomedical applications. X.J. Loh (Ed.), In: *In-Situ Gelling Polymers*. (s. 37-67). Singapore: Springer Science+Business Media.
- Lopes-Ramos, C.M., Pereira, T.C., Dogini, D.B., Gilioli, R. and Lopes-Cendes, I. (2016). Lithium carbonate and coenzyme Q10 reduce cell death in a cell model of Machado-Joseph disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49 (12), 1-7.
- Malhi, G.S., Gessler, D. and Outhred, T. (2017). The use of lithium for the treatment of bipolar disorder: recommendations from clinical practice guidelines. *Journal of Affective Disorders*, 217, 266-280.
- McKnight R.F., Adida, M., Budge, K., Stockton, S., Goodwin, G.M. and Geddes, R.J. (2012). Lithium toxicity profile: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 379 (9817), 721-728.

- Mohan, E.C., Kandukuri, J.M. and Allenki, V. (2009). Preparation and evaluation of in-situ-gels for ocular drug delivery. *Journal of Pharmacy Research*. 2 (6), 1089, 1094.
- Müller-Oerlinghausen, B., Ahrens, B., Grof, E., Grof, P., Lenz, G., Schou, M., Simhandl, C., Thau, K., Volk, J., Wolf, R. and Wolf, T. (1992). The effect of long-term lithium treatment on the mortality of patients with manic-depressive and schizoaffective illness. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 86 (3), 218-222.
- Nie, S., Hsiao, W.W., Pan, W. and Yang, Z. (2011). Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 151-166.
- Nirmal, H.B., Bakliwal, S.R. and Pawar, S.P. (2010). *In-situ* gel: new trends in controlled and sustained drug delivery system. *International Journal of PharmTech Research*, 2 (2), 1398-1408.
- Oishi, S. (2004). Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 42 (11), 1845-1849.
- Oktay Ş, ve Kayaalp S.O. (2012). İlaç uygulama yolları ve uygulama yerinden absorpsiyon. Kayaalp S.O. (Ed.), *Akılçıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. (s. 16-19). Ankara: Pelikan Yayıncılık.
- Öner, L. (2002). Kontrollü salım sistemlerinin biyoyararlanımı. A. Zırh Gürsoy (Ed.), *Kontrollü Salım Sistemleri*. (s. 383-400). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği.
- Özdamar, K. (1997). *Paket Programları ile İstatistiksel Veri Analizi (Çok Değişkenli Analizler)*. 2 (4). Eskişehir: Kaan Kitapevi.
- Öztürk, A.A. (2017). Deksketopfen Yüklü Kontrollü Salım Gösteren Nanonoboyutta İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve *İn Vitro/İn Vivo* Değerlendirilmesi. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Pol, E., Coumans, F.A.W., Grootemaat, A.E., Gardiner, C., Sargent, I.L., Harrison, P., Sturk, A., van Leeuwen T.G. and Nieuwland, R. (2014). Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12 (7), 1182-1192.
- Rawat, S., Warade, S. and Lahoti, S. (2010). *In situ* gel formulation of ornidazole for the treatment of periodontal disease. *Current Pharma Research*, 1 (1), 60-69.
- Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., and Minor, L. (2016). *In vitro* cell based assays: cell viability assays, In: *Assay Guidance Manual*. Sittampalam, G.S., Coussens, N.P. Brimacombe K. et al (Eds.) *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*. Amerika: Bethesda.
- Robinson, J.W. (1960). Atomic absorption spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 32 (8), 17A-29A.
- Ruel-Garièpy, E. and Leroux J.C. (2004). *In situ*-forming hydrogels-review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 409-426
- Schou, M., Juel-nielsen, N., Strömngren, E. and Voldby, H. (1954). The treatment of manic psychoses by the administration of lithium salts. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 17 (4), 250-260.
- Simamora, P., Pinsuwan, S., Alvarez, J.M., Myrdal, P.B. and Yalkowsky, S.H. (1995). Effect of pH on injection phlebitis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84 (4), 520-522.
- Soenen S.J., Manshian B., Montenegro J.M., Amin F., Meermann B., Thiron T., Cornelissen M., Vanhaecke F., Doak S., Parak W.J., Smedt S.D. and Braeckmans, K. (2012). Cytotoxic effects of gold nanoparticles: A multiparametric study. *ACS Nano*, 6 (7), 5767-5783.

- Srividya, B., Cardoza, R.M. and Amin, P.D. (2001). Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system. *Journal of Controlled Release*, 73 (2-3), 205-211.
- Şenel, S. (2014). Nanotaşıyıcılarda kullanılan polimerler. A. Zırh Gürsoy (Ed.), *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*. (s. 9-22). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği.
- Timmer, R.T. and Sands, J.M. (1999). Lithium intoxication, *Journal of the American Society of Nephrology*, 10 (3), 666-674.
- Tondo, L., Hennen, J. and Baldessarini R.J. (2001). Lower suicide risk with long-term lithium treatment in major affective illness: a meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 104 (3), 163-172.
- Tsuji, H., Horii, F., Hyon, S.H. and Ikada, Y. (1991). Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactic acid)s. 2. Stereocomplex formation in concentrated solutions. *Macromolecules*, 24 (10), 2719-2724.
- Uchida, M., Li, X.W., Mertens, P. and Alpar, H.O. (2009). Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790 (8), 754-764.
- Uhrich, K.E., Canizzaro, S.M., Langer, R.S., Shakesheff, K.M. (1999). Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *American Chemical Society*, 99 (11), 3181–3198.
- Vahip, S. (2004). Bipolar depresyon. *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 7 (1), 41-44.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G.J. and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. Cree I.A. (Ed.), *Cancer Cell Culture*. (s. 237-245). New York: Humana Press.
- Venus, M., Waterman, J. and McNab, I. (2011). Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, 29 (10), 471-474.

- Ward, W.K., Castle, J.R., Branigan, D.L., Massoud, R.G. and El Youssef, J. (2012). Discomfort from an Alkaline Formulation Delivered Subcutaneously in Humans. *Clinical Drug Investigation*, 32 (7), 433-438.
- Zeng, N., Mignet, N., Dumortier, G., Olivier, E., Seguin, J., Maury, M., Scherman, D., Rat, P. and Boudy, V. (2015). Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line. *International Journal of Pharmaceutics*, 495 (2), 1028-1037.
- Zhang, L., Parsons, D.L., Navarre, C. and Kompella, U.B. (2002). Development and in-vitro evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *Journal of Controlled Release*, 85 (1-3), 73-81.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C. and Xie, S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, 12 (3), 263-271.
- Zırh Gürsoy, A. (2002). Giriş. A. Zırh Gürsoy (Ed.), *Kontrollü Salım Sistemleri*. (s. 3-6). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği.
- Zırh Gürsoy, A. (2004). Enjeksiyonluk dozaj şekilleri, diğer steril çözeltiler, kan ve kan ürünleri. A. Zırh Gürsoy (Ed.), *Farmasötik Teknoloji- Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*. (s. 213-232). İstanbul: Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri.
- Zırh Gürsoy, A. (2004). Kontrollü salım sistemleri. A. Zırh Gürsoy (Ed.), *Farmasötik Teknoloji- Temel Konular ve Dozaj Şekilleri* (s. 409-422). İstanbul: Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri.