

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANJİOPLASTİDE KULLANILMAK ÜZERE
BİYOPARÇALANIR STENT FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMELERİNE İLİŞKİN ÇALIŞMALAR**

Ecz. Can SARISÖZEN

**Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2006

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANJİOPLASTİDE KULLANILMAK ÜZERE
BİYOPARÇALANIR STENT FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMELERİNE İLİŞKİN ÇALIŞMALAR**

Ecz. Can SARISÖZEN

**Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ**

**TEZ YARDIMCI DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Betül ARICA YEGİN**

ANKARA

2006

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Teknoloji Programı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

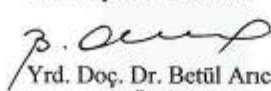
Jüri Başkanı:


Prof. Dr. A. Atilla Hıncal
Hacettepe Üniversitesi

Danışman:


Prof. Dr. Sema Çalış
Hacettepe Üniversitesi

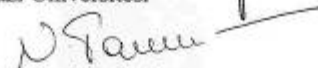
Yrd. Danışman:


Yrd. Doç. Dr. Betül Arca Yegin
Hacettepe Üniversitesi

Üye:


Prof. Dr. Nevin Çelebi
Gazi Üniversitesi

Üye:


Prof. Dr. Nilüfer Tarımcı
Ankara Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Hakan S. Orer (✓)
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilimsel bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her zaman yanımda olan ve karşılaştığım her türlü sorunu çözmem için beni tüm özverisi ile destekleyen değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Sema ÇALIŞ**'a, tezim süresince bilimsel katkılarını ve kişisel desteğini benden esirgemeyen, her konuda her zaman yardımını gördüğüm değerli hocam Sayın **Yrd. Doç. Dr. Betül ARICA**'ya teşekkürlerimi sunarım. Bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü olanağı sağlayan, her konuda yardımlarını benden esirgemeyen ve varlığını hep hissettiren değerli hocam Sayın **Prof. Dr. A. Atilla HINCAL**'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda, etkin maddenin fizikokimyasal ve kimyasal çalışmaları konusunda bana her zaman yardımcı olan değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Ünsal ÇALIŞ**'a, formülasyonlara ilişkin partikül büyüklüğü tayininde yardımcı olan değerli hocam Sayın **Doç.Dr. Zelihagül DEĞİM**'e ve araştırma görevlisi arkadaşım **Araş. Gör. Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ**'e, Diferansiyel Taramalı Kalorimetri analizlerinde bilgi ve becerilerini paylaştığım hocam Sayın **Prof. Dr. Feride SEVERCAN**'a, istatistiksel değerlendirmeler sırasında değerli yardımlarını gördüğüm hocam Sayın **Doç. Dr. Mehmet ORMAN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm **Ecz. (B.U.) Hakan EROĞLU**, **Ecz. (B.U.) İrem YENİCE**, **Ecz. (B.U.) Mustafa Sinan KAYNAK**, **Ecz. (B.U.) Sibel ŞAMDANCIOĞLU**, **Ecz. (B.U.) Pelin YARGAN**, **Ecz. (B.U.) Yasemin ÇIRPANLI**, **Ecz. (B.U.) Burcu SAYIN** başta olmak üzere Eczacılık Teknolojisi Bölümü'ndeki tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, değerli hocalarıma ve idari personelimize teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca sevgi ve anlayışlarıyla hep yanımda olan, tez çalışmalarım sırasında maddi ve manevi bütün destekleri ile beni yüreklendiren **anneme, babama, kardeşime** ve hayatımı sevgisi ile dolduran **Özlem BOZKURT**'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 0302301007).

ÖZET

Sarısözen, C. Anjioplasti’de Kullanılmak Üzere Biyoparçalanır Stent Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve İn Vitro Değerlendirilmelerine İlişkin Çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara, 2006. Stentler kardiyolojide daralan koroner damarların açılması için yaygın olarak kullanılan medikal cihazlardır. Metalik yapıları sayesinde damarın içinde bir destek yapısı oluşturular ve olası bir tekrar daralmanın (restenoz) önüne geçerler. Ancak mekanik engellemeye rağmen hastalarda restenoz görülme sıklığı % 10-30 civarındadır. Stentlerin restenozu açan hücresel olaylar üzerinde etkilerinin olamamasından kaynaklanan bu klinik tabloya stent-ichi restenoz adı verilmektedir. Stent-ichi restenozun giderilmesi için son yıllarda ilaç salan stentler geliştirilmiştir. Etkin maddenin kontrollü ve uzun süreli salımıyla restenozun önlenmesi planlanmıştır. Stent-ichi restenozu engelleyerek görevini yerine getiren stentler uzun yıllar hastanın vücudunda yabancı bir materyal olarak kalmakta ve uzun vadede klinik olarak yol açabilecekleri sonuçlar bilinmemektedir. Bu durum gözönüne alınarak, PLGA (75:25) ve (50:50) polimerleri kullanılarak ilaç salan biyoparçalanır stentler hazırlanmıştır. Ayrıca metalik stentler üzerine kaplama yapılarak ilaç salan stent formülasyonları da geliştirilmiştir. Her iki yapıdan ilaç salımının uzatılması amacıyla 2^2 faktöriyel tasarımı kullanılarak kitosan mikrokürelerinin formülasyonları hazırlanmıştır. Prednizolon asetat model ilaç olarak seçilmiş ve mikroküreler içine yüklenmiş, ayrıca PLGA polimerlerinin içerisinde etkin madde olarak prednizolon asetat ve prednizolon asetat yüklü mikroküreler disperse edilmiştir. Hazırlanan prednizolon asetat yüklü kitosan mikrokürelerinin in vitro karakterizasyon çalışmaları yapılmış, biyoparçalanır stentlerin ve polimer kaplı metalik stentlerin yüzey özellikleri ile in vitro salım özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda etkin madde içeren biyoparçalanır stentlerden salımın mikrokürelere göre daha yavaş olduğu gözlenmiştir. En uzun salım mikroküre içeren biyoparçalanır stentlerden elde edilmiştir. Stentler mekanik dirençlerini salım süresince korumuşlardır. Polimer kaplı stentlerden ise bir ay boyunca ilaç salımı takip edilmiştir. Organizma ile uyumlu biyoparçalanır özellikte olan, restenozun önlenmesi için kullanılması öngörülen stent şekilleri üzerinde formülasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak, anjioplastide kullanılmaya aday olabilecek etkin madde/etkin madde yüklü mikroküre içeren biyoparçalanır stentler ve biyoparçalanır polimerle kaplı stentlerin formüle edilebildiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kardiyovasküler stent, kitosan mikroküre, prednizolon asetat, anjioplasti, restenoz.

Destekleyen Kurum: H.Ü.B.A.B. Kapsamlı Araştırma Projesi (Proje No: 0302301007)

ABSTRACT

Sarısözen C., Development and in-vitro studies for the evaluation of the biodegradable stent formulations intended for use in angioplasty, Hacettepe University Institute of Health, Master of Science Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara 2006. Stents are the medical devices which are widely used for the enlargement of the veins. Due to their metallic structure, they provide support for the veins, and prevent a possible re-stenosis. The reoccurrence percentage of restenosis varies between 10-30% even though this mechanical support is provided. Cardiovascular stents do not provide any effect on the cellular mechanisms of restenosis which is called in-stent restenosis. Recently, in order to prevent in-stent restenosis, stents containing some specific drugs were evaluated. The prolonged and sustained release of the drugs was planned for the inhibition of restenosis. Even though these stents will remain in the human body for many years there is no clinical data supporting their fate in the human body during this time. With respect to this situation, the biodegradable drug containing PLGA (75:25) and (50:50) stents are formulated. Also, drug releasing formulations were prepared by coating the surface of the metallic stents. In order to prolong the release of the active ingredient from both of these structures, chitosan microsphere formulations were prepared by 2^2 factorial design. As the model drug, prednisolone acetate was incorporated into the microspheres, both these microspheres and the active ingredient itself was dispersed in the PLGA polymer solution. The in vitro characteristics of the chitosan microspheres containing prednisolone acetate were evaluated and the surface characteristics and in vitro release profiles of the PLGA stent formulations and coated metallic stent formulations were investigated. The data obtained showed, the release profiles of the biodegradable stent formulations were slower with respect to the microsphere formulations. The longest release profile was obtained with the formulation of stents containing prednisolone acetate chitosan microspheres. In this study, the in vitro characterizations for these formulations were fully evaluated. As a result, the suitable stent formulations containing prednisolone acetate/prednisolone acetate microspheres were seemed to be formulated which might be a candidate for using in angioplasty. These stent formulations are intended for preventing the restenosis.

Key Words: Cardiovascular stent, chitosan microsphere, prednisolone acetate, angioplasty, restenosis

Supporting Institute: H.U.S.R.U (Hacettepe University Scientific Research Unit) Research Project (No: 0302301007)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Medikal Cihazlar	5
2.1.1. Medikal Cihaz Tanımı	5
2.1.2. Medikal Cihazların Sağlık Alanındaki Önemi ve Kullanılışları	6
2.1.3. Medikal Cihazlar ve Tıbbi Ürünler (Medicinal Product) Arasındaki Farklar	7
2.1.4. İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanılan Medikal Cihazlar	8
2.1.5. Medikal Cihaz Direktifi ve Medikal Cihazların Sınıflandırılmaları	9
2.1.5.1. Sınıflandırma Kuralları	10
2.1.6. Kardiyovasküler Sistemde Kullanılan Medikal Cihazlar	12
2.2. Terminoloji	13
2.3. Koroner Arter Hastalığı	14
2.3.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi	14
2.3.2. Koroner Arter Hastalığı'nın Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	14
2.3.3. Anjioplasti Tanımı ve Açıklamalar	15
2.3.4. Restenoz, Tanımı ve Oluşum Mekanizmaları	17
2.4. Stentler	18
2.4.1. Stent Tanımı	18
2.4.2. Stentlerin Uygulanmaları	18

2.4.3.	Stentlerin Üstünlükleri ve Sakıncaları	20
2.5.	İlaç Salan Stentler (DES-Drug Eluting Stents)	23
2.5.1.	İlaç Salan Stentlerin Gelişimi ve Kullanımı	23
2.5.1.1.	İlaç	24
2.5.1.2	Polimer Matriksi	25
2.5.1.3.	Stent	26
2.5.2.	İlaç Salan Stentlerden İlaç Salımı	26
2.5.3.	İlaç Salan Stentlerin Üstünlük ve Sakıncaları	27
2.6.	Biyoparçalanır Stentler	27
2.6.1.	Poli laktid (PLA), Poli glikolid (PGA) ve Poli laktid-ko-glikolid (PLGA)	28
2.6.2	Biyoparçalanır Stentlerin Gelişimi ve Kullanımları	28
2.6.3.	Biyoparçalanır Stentlerin Üstünlük ve Sakıncaları	29
2.7.	Mikroküreler	32
2.7.1.	Mikrokürelerin Özellikleri	32
2.7.2.	Mikroküre Hazırlamada Kullanılan Polimerler	33
2.7.3.	Kitosan ve Kitosan Kullanılarak Hazırlanan Mikroküreler	33
2.7.4.	Kitosan Polimeri ile Mikroküre Hazırlama Yöntemleri	33
2.7.4.1.	Püskürterek Kurutma Yöntemi	34
2.8.	İstatistiksel Yöntemler	37
2.8.1.	Faktöriyel Tasarım Tanımı	37
2.8.2.	Kullanım Amacı	38
2.8.3.	2 ² Faktöriyel Tasarım	38
2.8.4.	Faktöriyel Tasarımda Kullanılan Grafikler	39
2.9.	Prednizolon asetat	40
2.9.1.	Fizikokimyasal Özellikleri	40

2.9.2.	Miktar Tayini Yöntemleri	41
2.9.3.	Farmakolojik Özellikleri	41
2.9.4.	Stabilitesi	42
2.9.5.	Piyasa Preparatları	42
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1.	Araçlar ve Gereçler	43
3.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	43
3.1.2.	Kullanılan Aletler	44
3.2.	Yöntemler ve Deneyler	45
3.2.1.	Prednizolon Asetatın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	45
3.2.1.1.	UV Spektrumu	45
3.2.1.2.	FT-IR Spektrumu	45
3.2.1.3.	Erime Derecesi Tayini	45
3.2.1.4.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	46
3.2.2.	Prednizolon Asetatın Spektrofotometrik Miktar Tayini	46
3.2.2.1.	Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması	46
3.2.2.2.	Analitik Yöntem Validasyonu	47
3.2.2.2.1.	Özgünlük	47
3.2.2.2.2.	Doğrusallık	47
3.2.2.2.3.	Doğruluk	48
3.2.2.2.4.	Kesinlik	48
3.2.2.2.5.	Stabilite	49
3.2.3.	Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	49
3.2.3.1.	Viskozite Çalışmaları	50
3.2.3.2.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Termogramlarının İncelenmesi	50
3.2.4.	Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması	51
3.2.4.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	51
3.2.4.2.	Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanmasında Kullanılan Faktöriyel	52

	Tasarım	
3.2.4.3.	Püskürterek Kurutma Yöntemi ile Mikrokürelerin Hazırlanması	53
3.2.5.	Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu	56
3.2.5.1.	Morfolojik Özellikler	56
3.2.5.2.	Partikül Büyüklüğü Tayini	56
3.2.5.3.	Mikrokürelerin Üretim Verimi	56
3.2.5.4.	Mikrokürelere Yüklenen Prednizolon Asetat Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	57
3.2.5.5.	Mikrokürelerin Termodinamik Özelliklerinin Araştırılması	57
3.2.5.6.	İn Vitro Salım Deneyleri	58
3.2.5.6.1.	Salım Ortamı ve Deneyin Yapılışı	58
3.2.5.6.2.	İn Vitro Salım Deneylerinin Validasyonu	59
3.2.6.	Biyoparçalanır PLGA Stentlerinin Hazırlanması	59
3.2.6.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	59
3.2.6.2.	Stentlerin Hazırlanmasında Kullanılan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) Polimer Filmlerinin Hazırlanması	60
3.2.6.3.	Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması	61
3.2.6.4.	Etkin Madde ve Mikroküre İçeren Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması	62
3.2.7.	Hazırlanan Biyoparçalanır Stentlerin Karakterizasyonu	65
3.2.7.1.	Polimer Filmlerinin Şişme ve Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi	65
3.2.7.2.	Hazırlanan Polimer Filmlerinin ve Stentlerin Kalınlık Kontrolü	65
3.2.7.3.	Hazırlanan Stent Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	66
3.2.7.4.	Biyoparçalanır Stentlerden Prednizolon Asetatın İn Vitro Salım Çalışması	66
3.2.8.	Etkin Madde İçeren Kaplı Stent Formülasyonlarının Hazırlanması	67
3.2.8.1.	Metalik Stentlerin Biyoparçalanır Polimerlerle Kaplanması	67
3.2.8.2.	Stentlerin Etkin Madde ve Mikroküre İçeren Polimer Çözeltileriyle Kaplanması	68

3.2.9.	İlaç Kaplı Stent Formülasyonlarının Karakterizasyonu	69
3.2.9.1.	Kaplı Stentlerin Açılma Kontrolü	69
3.2.9.2.	Kaplı Stentlerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	70
3.2.9.3.	Prednizolon Asetat ve Prednizolon Asetat Yüklü Mikroküre İçeren Polimerlerle Kaplı Stentlerden İn Vitro Salım Çalışmaları	70
4.	BULGULAR	71
4.1.	Prednizolon Asetatın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalara İlişkin Bulgular	71
4.1.1.	UV Spektrumu	71
4.1.2.	FT-IR Spektrumu	71
4.1.3.	Erime Derecesi Tayini	73
4.1.4.	DSC Termogramı	73
4.2.	Prednizolon Asetatın Spektrofotometrik Miktar Tayini	74
4.2.1.	Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması	74
4.2.2.	Analitik Yöntem Validasyonu	75
4.2.2.1.	Özgünlük	75
4.2.2.2.	Doğrusallık	75
4.2.2.3.	Doğruluk	75
4.2.2.4.	Kesinlik	76
4.2.2.5.	Stabilite	77
4.3.	Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	78
4.3.1.	Viskozite Çalışmaları	78
4.3.2.	DSC Termogramlarının İncelenmesi	80
4.4.	Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması	82

4.4.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	82
4.4.2.	Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanmasında Kullanılan Faktöriyel Tasarım	83
4.4.3.	Püskürterek Kurutma Yöntemi ile Mikrokürelerin Hazırlanması	89
4.5.	Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu	89
4.5.1.	Morfolojik Özellikler	89
4.5.2.	Partikül Büyüklüğü Tayini	93
4.5.3.	Mikrokürelerin Üretim Verimi	94
4.5.4.	Mikrokürelere Yüklenen Prednizolon Asetat Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	95
4.5.5.	Mikrokürelerin Termodinamik Özelliklerinin Araştırılması	95
4.5.6.	İn Vitro Salım Deneyleri	97
4.5.6.1.	Salım Ortamı ve Deneyin Yapılışı	97
4.5.6.2.	İn Vitro Salım Deneylerinin Validasyonu	101
4.6.	Biyoparçalanır PLGA Stentlerinin Hazırlanması	101
4.6.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	101
4.6.2.	Stentlerin Hazırlanmasında Kullanılacak Olan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) Polimer Filmlerinin Hazırlanması	102
4.6.3.	Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması	103
4.6.4.	Etkin Madde ve Mikroküre İçeren Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması	103
4.7.	Hazırlanan Biyoparçalanır Stentlerin Karakterizasyonu	104
4.7.1.	Polimer Filmlerinin Şişme ve Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi	104
4.7.2.	Hazırlanan Polimer Filmlerinin ve Stentlerin Kalınlık Kontrolü	105
4.7.3.	Hazırlanan Stent Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	105
4.7.4.	Biyoparçalanır Stentlerden Prednizolon Asetatın İn Vitro Salım Çalışması	115
4.8.	Etkin Madde İçeren Kaplı Stent Formülasyonlarının Hazırlanması	118
4.8.1.	Metalik Stentlerin Biyoparçalanır Polimerlerle Kaplanması	118

4.8.2.	Stentlerin Etkin Madde Ve Mikroküre İçeren Polimer Çözeltileriyle Kaplanması	119
4.9.	İlaç Kaplı Stent Formülasyonlarının Karakterizasyonu	120
4.9.1.	Kaplı Stentlerin Açılma Kontrolü	120
4.9.2.	Kaplı Stentlerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	120
4.9.3.	Prednizolon Asetat ve Prednizolon Asetat Yüklü Mikroküre İçeren Polimerlerle Kaplı Stentlerden İn Vitro Salım Çalışmaları	125
5.	TARTIŞMA	128
5.1.	Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri ile İlgili Çalışmalar	128
5.2.	Prednizolon Asetatın Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	129
5.3.	Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	129
5.4.	Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması	131
5.4.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	131
5.4.2.	Faktöriyel Tasarım	133
5.4.3.	Püskürterek Kurutma Yöntemi ile Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması	135
5.5.	Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu	137
5.5.1.	Morfolojik Özellikler	137
5.5.2.	Partikül Büyüklüğü Tayini	138
5.5.3.	Mikrokürelerin Üretim Verimi	140
5.5.4.	Mikrokürelere Yüklenen Prednizolon Asetat Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	141
5.5.5.	DSC ile Mikrokürelerin Termodinamik Özelliklerinin Araştırılması	142
5.5.6.	İn Vitro Salım Deneyleri	143
5.6.	Biyoparçalanır PLGA Stentlerinin Hazırlanması	146
5.6.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	146
5.6.2.	Stentlerin Hazırlanmasında Kullanılan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) Polimer Filmlerinin Hazırlanması	151
5.6.3.	Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması	151

5.6.4.	Etkin Madde ve Mikroküre İçeren Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması	152
5.7.	Hazırlanan Biyoparçalanır Stentlerin Karakterizasyonu	153
5.7.1.	Polimer Filmlerinin Şişme ve Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi	153
5.7.2.	Hazırlanan Polimer Filmlerinin ve Stentlerin Kalınlık Kontrolü	154
5.7.3.	Hazırlanan Stent Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	155
5.7.4.	Biyoparçalanır Stentlerden Prednizolon Asetatın İn Vitro Salım Çalışması	157
5.8.	Etkin Madde İçeren Kaplı Stent Formülasyonlarının Hazırlanması	159
5.8.1.	Metalik Stentlerin Biyoparçalanır Polimerlerle Kaplanması	159
5.8.2.	İlaç Kaplı Stent Formülasyonlarının Karakterizasyonu	160
5.8.2.1.	Kaplı Stentlerin Açılma Kontrolü	160
5.8.2.2.	Kaplı Stentlerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	161
5.8.2.3.	Prednizolon Asetat ve Prednizolon Asetat Yüklü Mikroküre İçeren Polimerlerle Kaplı Stentlerden İn Vitro Salım Çalışmaları	162
	SONUÇLAR	165
	KAYNAKLAR	167
	ÖZGEÇMİŞ	186
	EKLER	
	EK 1	
	EK 2	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DES	Drug eluting stents (İlaç salan stentler)
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
FT-IR	Fourier-Transform Infra Red
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KAH	Koroner arter hastalığı
M.A	Molekül ağırlığı
PBS	Phosphate buffered saline
PGA	Poli glikolid
PLA	Poli laktid
PLGA	Poli(laktid-ko-glikolid)
PLLA	Poli L-laktid
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SS	Standart sapma
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviyole
VK	Varyasyon katsayısı
X	Ortalama

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Anjioplasti uygulaması	16
2.2. Anjioplasti balonu üzerine sabitlenmiş bir stentin; (A) uygulama öncesi şekli (B) balonun şişirilmesi ile açık şekli	18
2.3. Stent uygulamaları	19
2.4. Stent Yapıları. A: Helikal Yapı, B: Mikrofilament Yapı	30
2.5. Çalışmalarımızda kullanılan püskürterek kurutucunun (Büchi 190 Mini Spray Dryer) şematik gösterimi (A: Hava akış hızı kontrol düğmesi, B: Pompa hızı ayarlama düğmesi, C: Aspiratör seviyesi ayarlama düğmesi, D: Sıcaklık ayar düğmesi, E: Giriş sıcaklığı göstergesi, F: Çıkış sıcaklığı göstergesi)	35
2.6. 2 ² faktöriyel tasarım kombinasyon noktaları	38
2.7. Cevap yüzey grafikleri ve izdüşüm haritaları Etkileşimin olmadığı durumda A: cevap yüzey grafiği, B: izdüşüm haritası Etkileşimin olduğu durumda C: cevap yüzey grafiği, D: izdüşüm haritası	40
2.8. Prednizolon asetat'ın kimyasal yapısı	41
3.1. 2 ² faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının içeriklerinin şematik gösterimi	55
3.2. 2 ² faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının üretim şeması	55
3.3. Biyoparçalanır stentlerin hazırlanmasının şematik gösterimi	62
3.4. Etkin madde ve mikroküre içeren biyoparçalanır stentlerin hazırlanmasının şematik gösterimi	64
3.5. Stentlerin polimer çözeltisi ile (PLGA 75:25 veya PLGA 50:50) kaplanması sırasında takip edilen işlemlerin şekilsel gösterimi	69
4.1. Prednizolon asetata ilişkin UV spektrumu	71

4.2.	Prednizolon asetata ilişkin IR spektrumu A: Çekilen spektrum, B: Referans (171)	72
4.3.	Prednizolon asetatin DSC termogramı	73
4.4.	Prednizolon asetatin % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi	74
4.5.	Düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin reogramları (n=3)	79
4.6.	Orta molekül ağırlıklı kitosan polimerinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin reogramları (n=3)	79
4.7.	Orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerlerine ilişkin DSC termogramları	81
4.8.	PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerlerine ilişkin DSC termogramları	81
4.9.	Orta molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken <i>ortalama partikül büyüklüğüne</i> ilişkin yüzey-cevap grafiği	86
4.10.	Orta molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken <i>yüklenen prednizolon asetat miktarına</i> ilişkin yüzey-cevap grafiği	86
4.11.	Orta molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken <i>t_{%50}</i> 'ye ilişkin yüzey- cevap grafiği	87
4.12.	Düşük molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken <i>ortalama partikül büyüklüğüne</i> ilişkin yüzey-cevap grafiği	87
4.13.	Düşük molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken <i>Yüklenen prednizolon asetat miktarına</i> ilişkin yüzey-cevap grafiği	88
4.14.	Düşük molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken <i>t_{%50}</i> 'ye ilişkin yüzey-cevap grafiği	88
4.15.	Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan etkin madde içermeyen mikroküre formülasyonlarına ilişkin SEM fotoğrafları A: % 0,5 (a/h) kitosan konsantrasyonu (CL0,5 formülasyonu) B: % 1 (a/h) kitosan konsantrasyonu (CL1 formülasyonu)	90

4.16.	Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan etkin madde içermeyen mikroküre formülasyonlarına ilişkin SEM fotoğrafları A: % 0,5 (a/h) kitosan konsantrasyonu (CM0,5 formülasyonu) B: % 1 (a/h) kitosan konsantrasyonu (CM1 formülasyonu)	90
4.17.	Düşük molekül ağırlıklı kitosan polimeri kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin SEM fotoğrafları (A) ve (B) % 0,5 (a/h) kitosan ve % 10 prednizolon asetat içeren formülasyon (CL0,5PA10) (C) % 0,5 (a/h) kitosan ve % 20 prednizolon asetat içeren formülasyon (CL0,5PA20) (D) ve (E) % 1 (a/h) kitosan ve % 10 prednizolon asetat içeren formülasyon (CL1PA10) (F) ve (G) % 1 (a/h) kitosan ve % 20 prednizolon asetat içeren formülasyon (CL0,5PA20)	91
4.18.	Orta molekül ağırlıklı kitosan polimeri kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin SEM fotoğrafları (A) % 0,5 (a/h) kitosan ve % 10 prednizolon asetat içeren formülasyon (CM0,5PA10) (B) ve (C) % 0,5 (a/h) kitosan ve % 20 prednizolon asetat içeren formülasyon (CM0,5PA20) (D) ve (E) % 1 (a/h) kitosan ve % 10 prednizolon asetat içeren formülasyon (CM1PA10) (F) ve (G) % 1 (a/h) kitosan ve % 20 prednizolon asetat içeren formülasyon (CM0,5PA20)	92
4.19.	Mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılım grafikleri (A) CM1 ve (B) CM1PA20	94
4.20.	Düşük molekül ağırlıklı % 1 (a/h) kitosan kullanılarak hazırlanan % 20 etkin madde içeren (CL1PA20 formülasyonu) ve içermeyen mikroküre (CL1) formülasyonlarının DSC termogramları	96

4.21.	Orta molekül ağırlıklı % 1 (a/h) kitosan kullanılarak hazırlanan % 20 etkin madde içeren (CM1PA20 formülasyonu) ve içermeyen mikroküre (CM1) formülasyonlarının DSC termogramları	96
4.22.	Orta molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarından prednizolon asetat salımı (n=6)	100
4.23.	Düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarından prednizolon asetat salımı (n=6)	100
4.24.	Hazırlanan polimer filmlerinin su absorplama profilleri (n=6)	104
4.25.	Oda sıcaklığında kurutularak elde edilen filmler. A ve B: PLGA (75:25), C ve D: PLGA (50:50) polimer filmi (Dijital kamera ile görüntülenmiştir)	106
4.26.	Buzdolabında bekletmeyi takiben etüvde kurutulan polimer filmlerinin görüntüleri. A ve B: PLGA (75:25) filmleri, C ve D: PLGA (50:50) filmleri (Dijital kamera ile görüntülenmiştir)	107
4.27.	PLGA (75:25) polimeri ile hazırlanan biyoparçalanır stentlerin görüntüleri. A ve B: Etkin madde içermeyen stentler. C, D ve E: Etkin madde (Prednizolon asetat) içeren stentler F, G ve H: Etkin madde yüklü kitosan mikroküre içeren stentler	108
4.28.	PLGA (50:50) polimeri ile hazırlanan biyoparçalanır stentlerin görüntüleri. A ve B: Etkin madde içermeyen stentler. C, D ve E: Etkin madde (Prednizolon asetat) içeren stentler F, G ve H: Etkin madde yüklü kitosan mikroküre içeren stentler	109
4.29.	Biyoparçalanır polimerlerle üretilen stentlerin yüzey fotoğrafları A-B: PLGA (75:25) kullanılarak üretilen stentler C-D: PLGA (50:50) kullanılarak üretilen stentler	110
4.30.	Prednizolon asetat içeren PLGA (75:25) polimeri kullanılarak üretilen biyoparçalanır stentin SEM fotoğrafları	111
4.31.	Prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren PLGA (75:25) polimeri kullanılarak üretilen biyoparçalanır stentin SEM fotoğrafları	112

4.32.	Prednizolon asetat içeren PLGA (50:50) polimeri kullanılarak üretilen biyoparçalanır stentin SEM fotoğrafları	113
4.33.	Prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren PLGA (50:50) polimeri kullanılarak üretilen biyoparçalanır stentin SEM fotoğrafları	114
4.34.	Prednizolon asetat yüklü biyoparçalanır stent formülasyonlarından salım profilleri (n=6, $X \pm SS$)	115
4.35.	İn vitro salım ortamında 10 gün sonunda prednizolon asetat içeren stentler A: PLGA (75:25) (S1) stenti, B: PLGA (50:50) (S3) stenti	116
4.36.	İn vitro salım ortamında 40 gün sonunda prednizolon asetat içeren stentler A: PLGA (75:25) (S1) stenti, B: PLGA (50:50) (S3) stenti	117
4.37.	İn vitro salım ortamında 40 gün sonunda prednizolon asetat yüklü mikroküre içeren stentler A: PLGA (75:25) stentleri (S2), B: PLGA (50:50) stentleri	117
4.38.	Kaplama yapılmamış durumda ve kapalı haldeki metalik stentin SEM fotoğrafı	121
4.39.	Kaplama yapılan stent fotoğrafları. A: PLGA (75:25), B: PLGA (75:25) içinde etkin madde, C: PLGA (75:25) içinde mikroküre D: PLGA (50:50), E: PLGA (50:50) içinde etkin madde, F: PLGA (50:50) içinde mikroküre	122
4.40.	Prednizolon asetat içeren ve PLGA (75:25) çözeltisi ile kaplanmış metalik stentin farklı büyütme oranlarındaki SEM fotoğrafları	123
4.41.	Prednizolon asetat içeren ve PLGA (50:50) çözeltisi ile kaplanmış metalik stentin farklı büyütme oranlarındaki SEM fotoğrafları	124
4.42.	Metalik stentler üzerine mikroküre içeren PLGA (75:25) polimeri kullanarak yapılan kaplamanın SEM fotoğrafları	124
4.43.	Metalik stentler üzerine mikroküre içeren PLGA (50:50) polimeri kullanarak yapılan kaplamanın SEM fotoğrafları	125

4.44. PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimeri ile kaplama yapılan metalik stentlerden prednizolon asetat salımı (n=6, $\bar{X} \pm SS$)	126
---	------------

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Medikal cihazların risk seviyelerine göre sınıflandırılmaları	10
2.2. Ticari olarak kullanımda olan stentler	20
2.3. Literatürde yer alan ilaç salan stent çalışmaları	25
2.4. Literatürde yer alan püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikrokürelerine ilişkin çalışmalar	37
2.5. 2 ² faktöriyel tasarımda yapılan denemeler	39
3.1. Kullanılan polimerlerin DSC analizleri şartları	51
3.2. Kullanılan 2 ² faktöriyel tasarımda etkenler ve düzeyleri	52
3.3. 2 ² faktöriyel tasarım uygulanarak hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve bileşenleri	53
3.4. Prednizolon asetat ve Prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren biyoparçalanır stent formülasyonları ve bileşenleri	64
4.1. Doğruluk analiz sonuçları (n=6)	76
4.2. Prednizolon asetat için analitik yöntemin tekrar edilebilirlik sonuçları	76
4.3. Prednizolon asetat için analitik yöntemin tekrar elde edilebilirlik sonuçları	77
4.4. Prednizolon asetatın in vitro salım ortamında ve koşullarında stabilite sonuçları (n=6)	78
4.5. Kitosan çözeltilerinin 25 ± 2 °C ve 76,8 sn ⁻¹ kayma hızındaki viskozite değerleri (n=3)	80
4.6. Kitosan mikrokürelerinin formülasyon öncesi çalışmalarına ilişkin bulgular	83
4.7. Orta molekül ağırlığına sahip kitosan polimeri ile hazırlanan formülasyonlara ilişkin regresyon analizi değerleri	84
4.8. Düşük molekül ağırlığına sahip kitosan polimeri ile hazırlanan formülasyonlara ilişkin regresyon analizi değerleri	84
4.9. Prednizolon asetat içeren ve içermeyen mikroküre formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları	93

4.10.	Prednizolon asetat içeren ve içermeyen mikroküre formülasyonlarına ilişkin üretim verimi sonuçları	94
4.11.	Prednizolon asetat içeren mikroküre formülasyonlarına ilişkin yükleme etkinliği sonuçları	95
4.12.	Mikroküre formülasyonlarına ilişkin salım kinetiklerinin değerlendirilmesi	99
4.13.	Kitosan mikroküre formülasyonlarından in vitro salım deneylerinin validasyonuna ilişkin bulgular	101
4.14.	Polimer filmlerinin ve hazırlanan stentlerin kalınlıkları (n=12)	105
4.15.	Biyoparçalanır stent formülasyonlarından in vitro salım deneylerinin validasyonuna ilişkin bulgular	118

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Koroner arter hastalıkları, dünyada ve Türkiye'de ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Bu tür hastalıklarda damarlarda oluşan daralmaları ve tıkanmaları (stenoz) açmak için ilaç tedavisi, bypass ameliyatları, koroner anjioplasti teknikleri olan balon anjioplasti ve stent kullanımı klinik olarak uygulanan yaklaşımlar arasındadır. Sistemik ilaç uygulamaları genellikle tedavinin ihtiyaç duyulduğu bölgeye lokal olarak yeterli konsantrasyonda ilaç ulaştıramamaktadır. Bypass ameliyatları genel anestezi altında uzun süreli cerrahi girişim gerektirmesi, acil durumlarda hemen uygulanamaması gibi sebeplerle öncelikli olarak tercih edilen bir teknik değildir. Önemli bir tedavi seçeneği olan koroner anjioplasti teknikleri ise kolay, hızlı uygulanabilir olması ve düşük maliyet göstermeleri gibi sebeplerle yaygınlık kazanmış ve klinikte kabul görmüştür.

Balon anjioplasti tekniği, bir anjioplasti balonunun şişirilerek damarın içinde tıkanmaya neden olan plak tabakasının damarın çeperine doğru ittirilmesi ve tıkanıklığın giderilerek normal kan akışının sağlanması esasına dayanır. Bu tekniğin en önemli sakıncası, hastaların % 30-60'ında restenoz adı verilen klinik tablonun ortaya çıkmasıdır. Restenoz, açılan damarlarda meydana gelen tekrar tıkanma durumudur.

Stentler, damarlarda stenoz oluşumu sonucunda meydana gelen daralmaların açılması amacıyla kullanılan, silindirik tüp şeklinde medikal cihazlardır. Stentlerin metalik ağ yapısı, damarın açıldıktan sonra tekrar tıkanmasına karşı mekanik bir engel oluşturur. Mekanik engellemeye rağmen hastalarda restenoz görülme sıklığı % 10-30 civarındadır. Stentlerin restenoza yol açan hücresel olaylar üzerinde etkilerinin olamamasından kaynaklanan bu klinik tabloya stent-ichi restenoz adı verilmektedir.

Stent-ichi restenozun giderilmesi için son yıllarda ilaç salan stentler geliştirilmiştir. Bu sistemler, stentlerin uygulanmasından sonra damarların yaralanmaya karşı verdikleri yanıtta rol oynayan hücresel mekanizmaları engelleyen değişik özellikte ilaçlar içerirler. Stentin yapısı tekrar tıkanmaya karşı mekanik bir

destek görevi görürken, farmakolojik olarak aktif bileşen de kontrollü olarak salınarak hücrel olayları engellemektedir. Stent-içi restenozu engelleyerek görevini yerine getiren stentler uzun yıllar hastanın vücudunda yabancı bir materyal olarak kalmakta ve uzun vadede klinik olarak yol açabilecekleri sonuçlar bilinmemektedir.

Bu durum gözönüne alınarak son zamanlarda ilaç salan biyoparçalanır stentler üzerinde AR-GE çalışmaları yoğunluk kazanmıştır. Üzerinde araştırmaların sürdürüldüğü bu sistemler metalik bir stentin bütün işlevlerini yerine getiren biyoparçalanır polimerler kullanılarak hazırlandıkları için vücut içinde parçalanmaktadırlar. Biyoparçalanır ilaç salan stentlerin formülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere biyoparçalanır, biyouyumlu ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı bir polimer olan poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA) 75:25 ve PLGA 50:50 polimerleri tez çalışmamızda geliştirecek formülasyonlarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Restenoz tedavisinde kullanılacak etkin maddeden beklenen özellikleri sıralayacak olursak, restenozda rol oynayan hücrel mekanizmaları bir ya da birden fazla yoldan etkileyerek inhibe etmesi, hücrelere geçişinin yüksek oranda olması, düşük konsantrasyonlarda etkinlik göstermesi ve sistemik yan etkiye yol açmamasıdır. Genellikle, kortikosteroid yapılı ilaçlar, antiinflamatuvar etkileri nedeniyle restenozun engellenmesinde kullanılmaktadır. Tez çalışmamızda, bu amaçla antiinflamatuvar etkili bir ilaç olan prednizolon asetat, restenoz oluşum mekanizmasındaki basamaklardan biri olan intimal hiperplazinin proliferatif olarak önlenmesi amacıyla model ilaç olarak seçilmiş ve çalışmaya alınmıştır.

Bu çalışmanın amacı; yukarıda yapılan açıklamalar ve bu alandaki tekniğin güncel durumu hakkında verilen bilgiler doğrultusunda antiinflamatuvar etkili prednizolon asetat içeren, doğal bir biyopolimer olan kitosan mikrokürelerinin 2² faktöriyel tasarım kullanılarak formülasyonlarını geliştirmek, geliştirilen bu formülasyonlar üzerinde morfolojik özellikler, partikül büyüklüğü, hazırlama verimi, yükleme oranı, salım gibi in vitro karakterizasyon çalışmaları yapmak; PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerlerine sadece prednizolon asetat ve prednizolon

asetat yüklü kitosan mikrokürelerini karıştırarak bu karışımları stent kaplama matriksi olarak kullanmak, yapılan kaplamanın yüzey özelliklerini, mekanik dayanıklılığını, bu kaplama matrikslerinden prednizolon asetatın in vitro salımını incelemek ayrıca PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerlerine prednizolon asetat ve prednizolon asetat içeren kitosan mikroküreleri karıştırarak biyoparçalanır stent formülasyonları geliştirmek, bu biyoparçalanır stentlerin fiziksel ve mekanik özelliklerini, su absorplama ve şişme özelliklerini, yüzey özelliklerini, in vitro ortamda prednizolon asetatın salım özelliklerini incelemek ve değerlendirilen bu özellikler doğrultusunda en uygun kaplı ve biyoparçalanır stent formülasyonlarını seçmektir.

2. GENEL BİLGİLER

İmplantlar, lokal bir alana uygulanan, vücut içinde bir bölgeye yerleştirilmek suretiyle sabitlenen ve spesifik bir bölgede kontrollü salım sağlamaları amacıyla kullanılan sistemlerdir (1). İmplant sistemlerin konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlere başlıca üstünlüğü, etkin maddenin lokal olarak etkisi istenen bölgeye ulaşmasına olanak vermeleridir (2). Böylece bu sistemler etkin maddenin istenen bölgede minimum etkin konsantrasyonunun üzerinde bulunmasını sağlamaktadır (3).

İmplant edilebilen sistemler ile lokal olarak ilaç salımında sağlanan üstünlükler (2, 4);

- ▲ Hedef bölgeye en yakın konuma yerleştirildikleri için daha az etkin madde dozuna ihtiyaç duyulması
- ▲ Doza bağlı olarak toksisitede azalma görülmesi
- ▲ Etkin maddenin uzun süre kontrollü olarak salımının sağlanması
- ▲ Sistemik dolaşıma ilaç geçişini minimuma indirdikleri için etkin maddeye bağlı istenmeyen sistemik etkilerden korunma elde edilmesidir.

İmplant edilebilen sistemlerin üstünlüklerine karşılık kullanılan materyallerin biyolojik uyumsuzluğu, biyoparçalanır özellikte olmayan sistemlerin yerleştirildikleri bölgeden uzaklaştırılabilmeleri için tekrar bir cerrahi müdahale gerekmesi, yapıda meydana gelen olası bir hasar sonucu içerdikleri etkin maddeyi yüksek dozlarda salmaları ve bu duruma bağlı toksisite riski gibi sakıncaları da bulunmaktadır.

İmplant edilebilen sistemler, ortopedi (5-7), oftalmoloji (7-9), diş hekimliği (7) ve kardiyoloji (10, 11) gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu bölümde, tez çalışmamızda üzerinde çalışmalar yaptığımız kardiyovasküler stentlerin implante edilebilen medikal cihazlar kapsamı içinde yer alması nedeniyle medikal cihazlar hakkında ayrıntılı bilgiler verilecektir.

2.1. Medikal Cihazlar

2.1.1. Medikal Cihaz Tanımı

Medikal cihazlar, tıbbi amaçlarla kullanılan, vücutta tanı, tedavi ya da izleme fonksiyonlarını mekanik ve fiziksel yollarla gerçekleştiren cihazlardır (12, 13). Resmi makamlarca harmonizasyonun sağlanması için yönergeler ve direktifler yayınlanarak kesin tanımlar ortaya konmuştur. Buna göre T.C. Tıbbi Cihaz Yönetmeliği'nde yer alan medikal cihaz tanımı;

İnsanda kullanıldıklarında asli fonksiyonunu, farmakolojik, kimyasal, immünolojik veya metabolik etkiler ile sağlamayan; fakat, fonksiyonunu yerine getirirken bu etkiler tarafından desteklenebilen ve insan üzerinde bir hastalığın, yaralanmanın, sakatlığın tanısı, tedavisi, izlenmesi ve kontrol altında tutulması, hafifletilmesi veya mağduriyetin giderilmesi, anatomik veya fizyolojik bir işlevin araştırılması, değiştirilmesi veya yerine başka bir şey konması, doğum kontrolü veya sadece ilaç uygulamak amacıyla üretilmiş, tek başına veya birlikte kullanılabilen, amaçlanan işlevini yerine getirebilmesi için gerekiyorsa bilgisayar yazılımı ile de kullanılan ve cansız hayvanların dokularından da elde edilen ürünler dahil olmak üzere, her türlü araç, alet, cihaz, aksesuar veya diğer malzemeleri kapsamaktadır (14).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'de medikal cihazlar için benzer bir tanım yapmıştır. Buna göre bir medikal cihaz;

- İnsanlarda ya da hayvanlarda, bir hastalık ya da diğer koşulların teşhisinde ya da iyileştirilmesinde, etkilerinin azaltılmasında, tedavisinde ya da bir hastalığın önlenmesinde kullanılması düşünülen,
- İnsanların ya da hayvanların vücutlarının bir fonksiyonuna ya da yapısına etkide bulunması için düşünülmüş ve öncelikli olarak gerçekleştirmesi düşünülen amaçlarını insan ya da hayvanların vücudunda kimyasal bir etkiyle göstermeyen ve öncelikli olarak göstermesi beklenen amaçlarından herhangi birinin etkisi metabolizasyona bağlı olmayan,

bir bileşen ya da aksesuar içeren bir alet, aparat, implant, makine, tertibat, in vitro reaktif ya da benzeri ilgili materyaldir (15).

2.1.2 Medikal Cihazların Sağlık Alanındaki Önemi ve Kullanılışları

Medikal cihaz terimi hemodiyaliz araçlarından basit penslere kadar bir çok farklı aracı kapsamaktadır. Bu amaçla Türkiye Cumhuriyeti, Avrupa Birliği'nin 93/42/EEC sayılı direktifini (16) esas olarak Tıbbi Cihaz Yönetmeliği'ni (13.03.2002 tarih ve 24694 sayılı) oluşturmuştur.

Medikal cihazlar, üretral sistem bozukluklarında (17-19), jinekolojide (20), kardiyovasküler sistemde görülen hastalıklarda (21-26), ortopedi alanında (27-29) sıklıkla kullanılmaktadırlar. Medikal cihazlar, ilaçların tedavi için yetersiz kaldığı ve farmakolojik etkiye ek olarak mekanik bir etkiye de ihtiyaç duyulan durumlarda hasta sağlığına hizmet etmektedirler. Medikal cihazların kullanımı ile hedef bölgeye direkt ilaç uygulanması (30,31), damar tıkanıklıklarının giderilmesi (11,32), ortopedik uygulamalarda enfeksiyon riskinin azaltılması medikal cihazların tıp ve eczacılık alanında sağladığı yararlar ve üstünlükler arasındadır.

Bununla beraber, bazı medikal cihazlar için uzun süren bir klinik değerlendirmenin yapılamamış olması (11,33,34), kullanılan materyallerin biyouyumluluğunda yaşanan sorunlar (18,35-37), konvansiyonel sistemler ile karşılaştırıldıklarında maliyetlerinin yüksek oluşları (38) ve hastalıkların tedavisi amaçlı çoğu medikal cihazın kullanılabilmesi için teknik eğitimli personelin gerekliliği medikal cihazların sakıncalarına örnekler olarak verilebilir.

Tez çalışmamızın konusu olan kardiyovasküler sistem hastalıkları ve bozukluklarında kullanılan stentlerin bu alanda tercih edilmelerinin sebepleri arasında; koroner arter hastalığının tedavisinde sistemik ilaç uygulamasının yetersiz kalışı (34,38,39), bir çok durumda mekanik bir destekle tedavinin mümkün oluşu, cerrahi olarak yapılan girişimlerin taşıdığı büyük risk (23) gösterilebilir.

2.1.3. Medikal Cihazlar ve Tıbbi Ürünler (Medicinal Product) Arasındaki Farklar

Tıbbi ürün sınıfına giren ürünler, “insanlarda ya da hayvanlarda, bir hastalığın önlenmesi ya da tedavisi için kullanılan madde ya da madde kombinasyonları”dır (40). Tıbbi ürünler ve medikal cihazlar iki farklı gruptur ve ruhsatlandırılmalarından kullanıma girmelerine kadar farklı aşamalardan geçerler.

Bir ürünün hangi direktif kapsamında yer aldığına, kısaca ilaç mı yoksa medikal cihaz mı olduğuna karar verilebilmesi için öncelikle sunulan ürünün önceden belirlenen kullanım amacı ve bu amaca hangi yolla ulaştığının değerlendirilmesi gerekmektedir. Burada *önceden belirlenen kullanım amacı* üretici tarafından cihazın etiketinde, kullanım kılavuzunda veya tanıtım broşüründe belirtilen kullanım amacı ile ilgili bilgilerdir. Birincil olarak öngörülen kullanım amacı bir ürünün medikal cihaz olarak tanımlanıp tanımlanamayacağıının en önemli göstergesidir. Bir medikal cihazın amaçlanan ve önceden belirlenen birincil kullanım amacı daha çok *fiziksel ve mekanik* kavramları ifade ederken bu amaç tıbbi ürünler için *farmakolojik, immünolojik ya da metabolik yolları* ifade etmektedir. Bununla beraber bir medikal cihaz önceden belirlenmiş olan kullanım amaçlarını yerine getirirken bir tıbbi üründen yardım da alabilir. Fakat bu ilaç bileşeninin görevi medikal cihazın asıl amacına yardımcı olmaktan öteye gitmemelidir. Bu durum örnek verilerek açıklanacak olursa; kemik çimentoları tek başlarına kullanıldıklarında medikal cihaz olarak tanımlanırlar çünkü amaçlanan görevlerini (bir protezin sabitlenmesi) mekanik yollarla gerçekleştirirler. Bu kemik çimentolarına antibiyotik eklenirse içerdikleri antibiyotik ameliyat sırasında ve sonrasında enfeksiyonu engellemekle görevlidir. Asıl kullanım amacı protezlerin sabitlenmesi iken (mekanik bir yolla), antibiyotik bu amaca ulaşırken sadece yardımcı bir rol üstlenmiştir. Bu yüzden antibiyotik içeren kemik çimentoları da medikal cihaz olarak adlandırılırlar. Fakat birincil olarak belirlenen kullanım amacı antibiyotiğin uygulama yerine iletilmesi olarak belirlenirse sistem artık tıbbi ürün olarak adlandırılır, çünkü içediği etkin madde, kullanım amacını gerçekleştiren yardımcı bileşen değil asıl bileşen haline gelmiştir (41).

Medikal cihaz olarak sınıflandırılan ürünlere verilebilecek örnekler aşağıda sıralanmıştır;

- kemik çimentoları
- diş dolgu malzemeleri
- biyoparçalanır ameliyat iplikleri
- kan torbaları
- uterus içine uygulanan cihazlar
- yumuşak ve sert doku iskeletleri (scaffold)
- hemodiyaliz çözeltileri

Yukarıda verilen örneklerle ek olarak, ayrı olarak kullanıldığında ilaç olarak adlandırılabilen fakat mekanik etkiye yardımcı olmak amacıyla bir etkin madde içeren medikal cihazlara örnek olarak;

- heparin ya da antibiyotik ile kaplı kataterler
- antibiyotik içeren kemik çimentoları
- antikoagülan ya da koruyucu içeren kan torbaları
- antimikrobiyal madde içeren yara kapatıcıları
- ilaç kaplı kardiyovasküler stentler verilebilir (41).

2.1.4. İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanılan Medikal Cihazlar

İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan medikal cihazların açıklamaları medikal cihazlara ilişkin yönetmelik ve direktiflerde açıklanmıştır (14,16). Tıbbi ürün yönetmeliği kapsamına giren bir ürünü uygulamak amacıyla kullanılan cihazlar medikal cihaz yönetmeliği altında değerlendirilir. Tıbbî ürün kendisi ile ilgili mevzuat kapsamında; tıbbî cihaz da medikal cihaz yönetmeliği kapsamında değerlendirilir (14).

İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan medikal cihazlara örnek olarak;

- ilaç uygulama pompaları
- implante edilebilen infüzyon pompaları
- insülin kartuşlarının takıldığı insülin kalemleri verilebilir (16, 41).

Bununla birlikte eğer medikal cihaz ve ilaç taşıyıcı sistem kombine halde tek bir ürün olarak kullanılıyorsa, tek kullanımlıksa, sistem sadece birlikte kullanılıyor ve ayrı ayrı kullanılamıyorsa medikal cihaz olarak değil tıbbi ürün olarak sınıflandırılır. Bu duruma örnekler;

- önceden doldurulmuş enjektörler
- transdermal ilaç taşınması için yamalar
- asıl amacı içerdiği tıbbi ürünü salmak olan polimerik matriks yapısındaki implantlar verilebilir.

Üretilen ürünün kullanım amacı içerdiği etkin maddeyi uygulama yerine iletmek ve amacını bu etkin madde üzerinden farmakolojik, immünolojik ve metabolik yollarla yerine getirmekse bu sistemler tıbbi ürün yönetmeliği (40) altında değerlendirilmektedir (41).

2.1.5. Medikal Cihaz Direktifi ve Medikal Cihazların Sınıflandırılmaları

Bu tezde direktif olarak geçen terim, Avrupa Birliği'nin yürürlüğe koyduğu ve üye ülkeler için uyulması gerekli olan uygulamaları ifade etmektedir. Bu direktifler, Avrupa Birliği içinde ticaret yapmak için uyulması gerekli olan kuralları, standartları ve yöntemleri içerirler (42). Kendilerine özgü standartları ve kalite güvence modellerini de beraberlerinde getiren medikal cihazlar hakkındaki direktiflerde medikal cihazların sınıflandırılmaları önemli bir yer tutmaktadır. Pek çok farklı ürün tipi ile çok geniş bir alana yayılma gösteren medikal cihazlar sınıflandırılarak farklı amaçlar için gruplara ayrılmışlardır (43).

Medikal cihazlar, tasarım ve üretimlerinden kaynaklanan potansiyel risk durumu ve insan sağlığı açısından yaratabilecekleri tehlike seviyelerine göre I., IIa, IIb. ve III. Sınıf olarak dört ana sınıfa ayrılırlar. Bu ana sınıflara dahil olan medikal cihazlar ve özellikleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Medikal cihazların risk seviyelerine göre sınıflandırılmaları (16,41,44)

Sınıf	Özellik	Örnek
I	- Hastalar açısından düşük risk taşıyan cihazlardır - Vücut içi ile bir temas halinde değildirler - Steril ya da ölçüm amaçlı olmadıkları sürece üreticinin kendisi tarafından sertifikalandırılabilirler	- Diş hekimliği el aletleri, koltuğu ve aksesuarları - Steril olmayan bandaj ve yara bakım ürünleri
II	a - Orta seviyede risk taşıyan cihazlardır - Sadece vücut boşluklarına girişimsel olarak uygulanır - Onaylanmış kuruluş tarafından üretim kalite sistemi kontrolüne tabi tutulmalıdırlar - ISO 9000/EN 46000 serileriyle uyum sağlamalıdırlar	- Ortodontik tel - Diş protezi
	b - Orta seviyede risk taşıyan cihazlardır - Kısmen ya da tamamen implante edilebilirler. - Üçüncü şahıslar tarafından sertifikalandırılmaları zorunludur - Hem üretim hem de tasarım için kalite sistemi kontrolüne tabi tutulmalıdırlar - ISO 9000/EN 46000 serileriyle uyum sağlamalıdırlar	- Hemodiyaliz çözeltileri - İnsülin iğnesi - Hemodializ cihazları
III	- Yüksek risk taşıyan cihazlardır - Yaşamsal organların ve yaşam destek birimlerinin fonksiyonlarını etkileyebilirler - Tasarım/klinik denemeler, ürün sertifikası ve kalite sistemi gerektirirler. Bütün sertifikalandırma yasal makamlarca yapılmalıdır. - ISO 9000/EN 46000 serileriyle uyum sağlamalıdırlar	- Stentler - Kalıcı kalp pilleri - Antibiyotik yüklü kemik çimentoları

2.1.5.1. Sınıflandırma Kuralları

Bir medikal cihazın sınıfını onun kullanım amacı belirlemektedir. Eğer cihazın teknik özelliklerinin cihazın amacı üzerine bir etkisi yoksa bu teknik özellikler cihazın sınıfının belirlenmesi için kullanılamaz. Ayrıca bir medikal cihaz üreticinin belirttiği amaç dışında bir amaç için kullanılıyorsa bu da cihazın sınıfını değiştirmemektedir (45).

Bir cihazın hangi sınıfa girdiğine karar verilmesi için hastayla temas süresi, girişimsellik ve cihazın kullanımından etkilenen vücut bölgesi gibi terimler sınıflandırmaya esas oluşturur ve cihazın sınıflandırma kurallarından ve ana sınıflardan hangisine girdiğini tayin ederler. Sınıflandırma kurallarında yer alan bazı tanımlar aşağıda verilmiştir:

- Süre esasına göre medikal cihazlar
 - **Geçici süreli:** Normalde 60 dakikadan az bir sürede ve devamlı kullanılması amaçlanan cihazlar.
 - **Kısa süreli:** Normalde 30 günden az ve sürekli kullanılması amaçlanan cihazlar.
 - **Uzun süreli:** Normalde 30 günden fazla ve sürekli kullanılması amaçlanan cihazlar (14).
- İnvaziv cihazlar: Bu cihazlar, vücut açıklığından veya vücut yüzeyini geçerek vücutun iç kısmına kısmen veya tamamen yerleştirilen cihazlardır.
 - **Cerrahi İnvaziv Cihaz:** Bu tip cihazlar, bir cerrahi müdahale sonucu vücut yüzeyini geçerek vücutun iç kısmına yerleştirilen cihazlardır.
 - **İmplant Edilebilen Cihazlar:** Cerrahi müdahale ile, bütünüyle insan vücuduna veya göz yüzeyine veya deri yüzeyine yerleştirilen ve yerleştirme işleminden sonra yerinde kalan cihazlardır. İnsan vücuduna cerrahi operasyonla kısmen takılan ve işleminden sonra en az 30 gün yerinde kalması öngörülen cihazlar da implant cihazlar olarak tanımlanır.

Medikal cihaz direktifinde, medikal cihazların sınıflandırılması için onsekiz kural belirlenmiştir. **Kural 1 - 4** invaziv olmayan cihazları, **Kural 5 - 8** invaziv cihazları, **Kural 9 - 12** aktif cihazları ve **Kural 13 - 18** ise özel kurallar altında sınıflandırılan cihazları belirtir.

Sözü geçen kurallardan, Kural 8 ve Kural 13, tez çalışmamızın konusu olan kardiyovasküler stentlerin yer aldığı sınıfları belirler. Genel hatları ile bu iki kuralın içeriklerine bakılacak olursa;

Kural 8: Uzun süreli kullanım için amaçlanan ve implante edilebilen medikal cihazları belirtir. Bu kural kapsamındaki cihazlardan sistemik dolaşım, kalp ya da sinir sistemi ile direkt temas için tasarlananlar Sınıf III'e girerler. Bunlara örnek olarak *vasküler stentler* ve yapay kalp kapakçıkları verilebilir.

Kural 13: Bu özel kural, ayrı olarak kullanıldığında tıbbi ürün olarak değerlendirilen ve medikal cihazın insan üzerindeki amaçlanan etkisine yardımcı olan bir maddeyi içeren kombinasyon halindeki cihazlardır. Bu kurala uyan medikal cihazlar, istenen etkilerini içerdikleri ilaç ile değil kendi fiziksel özellikleri ile sağlarlar, kullanılan etkin madde sadece istenen amaca yardımcı olur. Bu kural altındaki bütün cihazlar Sınıf III'e girerler. Antibiyotik içeren kemik çimentoları, heparin kaplı kataterler bu gruba örnek olarak verilebilir (14,16). Restenozun önlenmesi için kullanılan ve *ilaç yüklü olan stentler* de bu grup kapsamına girmektedirler.

2.1.6. Kardiyovasküler Sistemde Kullanılan Medikal Cihazlar

Medikal cihazların hayat kurtarıcı uygulamalar alanında oynadığı rol, kardiyovasküler sistem uygulamalarında en üst seviyededir. Kana oksijen verici cihazların geliştirilmesiyle açık kalp ameliyatları, koroner arter bypass ameliyatları, kapakçık değişimleri ve doğuştan gelen bozuklukların tedavisi mümkün olmuştur. Kalp kapakçığı protezleri, hem hayat kurtarma hem de yaşam kalitesini artırma bakımından çok önemli roller üstlenmişlerdir. Metalik silindirik ağ yapısındaki stentlerin, cerrahi bir girişim olmadan perkütan transluminal koroner anjioplasti ile uygulamaları, koroner arter hastalığının tedavisinde ve miyokard infarktüsün önlenmesinde devrimsel bir gelişme yaratmıştır. Bu sayede gelişmiş dünyadaki birincil ölüm sebebi olan aterosklerotik damar hastalığına sahip yüzbinlerce hastanın yaşam süresi ve kalitesi artırılmıştır (7).

Kardiyovasküler sistemde kullanılan medikal cihazların, implante edildikleri bölgedeki durumu hafifletmek ya da fonksiyonların işleyişini artırmak suretiyle uygulandıkları hastalara uzun süre boyunca yardım etmeleri bu alanda medikal

cihazların üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Fakat medikal cihaz hasarı ya da diğer doku-biyomateryal geçimsizlikleri klinik olarak gözlemlenebilecek sayıda soruna ve sonuçta ölüme yol açabilmektedir. Bu da uzun süren bir başarı ardından gelen bir başarısızlığa yol açmakta ve medikal cihazların sakıncalarını göstermektedir.

Genel olarak kardiyovasküler alanda kullanılan medikal cihazlar örnekleri arasında; koroner arter stentleri, yapay ve doğal kalp kapaçıkları ve implante edilen yapay kalpler sayılabilir.

2.2. Terminoloji

Bu bölümde kardiyovasküler alanda sıkça kullanılan tıbbi terimlerin açıklamaları verilecektir (46).

Aterosklerozis: Arterlerde görülen ve yağlı bileşenlerin damar duvarında birikerek, damarlarda sertleşmeye ve kan akımında azalmaya neden olan hastalık.

Kataterizasyon: Tedavi ya da teşhis amacıyla femoral arterden vücuda giriş yapılarak koroner arterlere kadar ulaşılması.

Koroner arter hastalığı: Çoğunlukla aterosklerozisin sebep olduğu, kalp arterlerini (koroner arterleri) etkileyen ve bu arterlerde kan akışının dolayısıyla oksijen taşınmasının azalmasına yol açan durum.

İntima: Damar iç çeperindeki düz kas hücrelerinden oluşmuş en dış tabaka.

İntimal hiperplazi: Damar duvarlarının intima tabakasında bulunan düz kas hücrelerinde görülen aşırı çoğalma durumu.

Stenoz: Damarlarda kan akışının azalmasına ya da engellenmesine neden olan damar açıklığında meydana gelen azalma durumu, tıkanma.

2.3. Koroner Arter Hastalığı

Bu bölümde tez çalışmamızın konusu olan stentlerin kullanıldığı kardiyovasküler bir hastalık olan koroner arter hastalığı ve tedavisi için uygulanan yaklaşımlar açıklanmıştır.

2.3.1. Tanımı ve Epidemiyolojisi

Koroner Arter Hastalığı (KAH) gelişmiş ülkelerde en sık görülen ölüm sebebidir (47-50). KAH arterlerde görülen ateromatoz plak oluşumuna yol açan ateroskleroz ile karakterize edilir (51). Aterosklerozis kronik, ilerleme gösteren çok odaklı bir hastalıktır (7).

Ateroskleroz öncelikli olarak 3 mm çapına kadar olan damarları etkiler ve aterosklerotik plak oluşuma yol açar. Aterosklerotik plak yapısı ana olarak iki yapıdan oluşur; (i) plağın çekirdek yapısı oluşturan lipit, (ii) bu çekirdek yapının etrafını çevreleyerek onun için koruyucu kılıf oluşturan bağ dokusu (7,47). Kanda yoğunlaşan lipit yapıdaki bileşenler, damar duvarlarında birikmeye başlayarak aterosklerotik plağın çekirdek yapısını oluştururken, düz kas hücreleri bu lipit çekirdeğin etrafını çevreleyerek plak oluşumuna katkıda bulunur. Bu şekilde arterlerde oluşan aterosklerotik plak yapıları damarlarda daralmaya ve sonuçta kan akışında azalmaya yol açarlar. Meydana gelen daralma stenoz olarak adlandırılır. Bir plak arterlerde % 50 ya da daha fazla daralmaya yol açarsa o damarın taşıdığı kan miktarında önemli bir azalma olur. Koroner damarlarda oluşan stenoz sonucu kalp dokusu ihtiyacı olan kanlanmayı sağlayamadığından bu durum kalp krizlerine, akut tıkanmalar sonucu ölümlere yol açabilmektedir.

2.3.2. Koroner Arter Hastalığı'nın Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

KAH tedavisinde güncel olarak kabul edilmiş olan üç ana teknik bulunmaktadır. Bu teknikler; (i) Sistemik ilaç tedavisi, (ii) Perkütan koroner girişimler ve (iii) Cerrahi girişimlerdir.

Bu yöntemlerden sistemik ilaç tedavisi genel olarak risk etkenlerini önlemeye yöneliktir. Bununla birlikte ilaç kullanımı aterosklerotik plak oluşumunu tam olarak engelleyememekte ayrıca oluşmuş olan plaklar üzerinde de tedavi edici bir etki yaratamamaktadır. Bu durumun en önemli sebeplerinden birisi etkin maddelerin plak oluşumu görülen bölgelere yeterli konsantrasyonlarda ulaşamamalarıdır.

KAH tedavisinde kullanılan önemli cerrahi girişim yöntemlerinden birisi koroner arter bypass ameliyatlarıdır (46,52). KAH tedavisinde, bypass ameliyatlarının uygulanmasına 1960'lı yılların sonunda başlanmıştır (46,53). Bypass ameliyatlarında cerrah, kol, göğüs ya da kolda bulunan sağlıklı bir damarı kullanarak, aterosklerotik plak yüzünden daralma (stenoz) görülen koroner arter bölgesinin etrafından dolaşacak bir alternatif yol yaratmaktadır. Bu sayede kan tıkanmış bölgeyi bypass eden yeni damarı kullanarak yoluna devam etmektedir (54,55). Önemli ve uzun bir cerrahi işlem olan bypass ameliyatları, sistemik ilaç uygulamasına kıyasla stenozin önüne geçmekte fakat genel anestezi altında yapılması, hastanede kalış süresinin uzunluğu, yeni yerleştirilen damarda da aterosklerotik plak oluşumunun olmayacağına dair bir güvence bulunmaması ve yüksek maliyetleri gibi sebeplerle son yıllarda tercih edilmemektedirler (46,55).

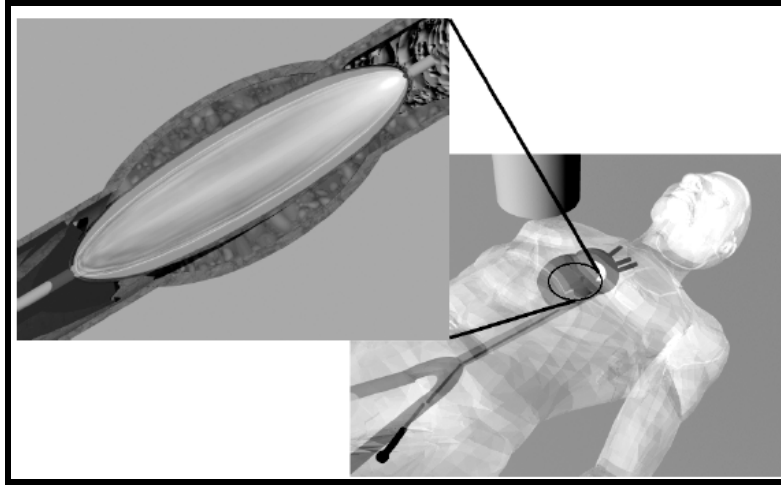
Her iki tedavi yönteminde belirtilen sakıncalar, uzmanları KAH tedavisinde daha az girişimsel ve daha etkili yeni bir teknik bulunması yolunda araştırmalara yönlendirmiştir.

2.3.3. Anjioplasti Tanımı ve Açıklamalar

Anjioplasti olarak adlandırılan teknik (Perkütan translüminal koroner anjioplasti) ilk olarak 1977 yılında Andreas Gruntzig tarafından gerçekleştirilmiştir (56). Anjioplasti işlemi yaklaşık 30 dakika süren katater temelli bir işlemdir.

Bu teknikte öncelikle bir izci-katater (guide-wire), lokal anestezi uygulanarak femoral arterden açılan bir girişten vücuda yerleştirilir. Bu katater stenozun bulunduğu koroner artere kadar ilerletilir. Daralmanın olduğu bölgeye ulaşıldığında,

izci-katater kullanılarak izlenen yol üzerinden ucunda anjioplasti balonu bulunan bir başka katater, istenen bölgeye kadar ilerletilir. Bu bölgede yaklaşık 10 bar basınç (lezyonun tipine ve kullanılan balona göre değişiklik gösterebilir) uygulanarak balon şişirilir. Böylece şişen balon etrafındaki plak tabakasını damar duvarına doğru sıkıştırır ve sonra balon tekrar indirilir ve işlemin sonunda daralmanın olduğu bölge açılmış olur (49,57,58). Şekil 2.1 anjioplastinin uygulanmasına ilişkin bir örnek gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Anjioplasti uygulaması (67).

Perkütan koroner anjioplasti tekniğinin gelişimi vasküler hastalıkların tedavisinde bir kilometre taşı olmuştur. 1970'lerin sonunda geliştirilen bu teknik, KAH'da görülen aterosklerotik plakların oluşturduğu tıkanıklıkların açılmasında %90'ın üzerinde bir başlangıç başarısı göstermiştir (59). Uygulanmaya başlanmasıyla birlikte geniş oranda kabul edilen bir teknik olmuş ve bypass ameliyatlarına göre daha sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (35,49). Koroner bypass ameliyatlarına kıyasla çok daha risksiz oluşu (53), işlemin süresinin kısalığı (7), hastanede yatış süresinin kısalığı (46) ve bypass ameliyatlarına göre maliyetinin düşüklüğü (47) anjioplasti uygulamalarının sistemik ilaç tedavisi ve bypass ameliyatlarına karşı üstünlükleri ve tercih edilmesinin sebepleri arasındadır.

2.3.4. Restenoz, Tanımı ve Oluşum Mekanizmaları

Anjioplastinin bir önceki bölümde anlatılan üstünlüklerine karşılık, uzun vadede restenoz adı verilen bir durum gözlenmekte ve bu da tekniğin başarısına gölge düşürmektedir. Genel kabul görmüş açıklamaya göre restenoz, daralmanın olduğu (stenoz) damarın açılmasından sonra en az % 50 oranında tekrar tıkanmasıdır (51,54,56,60).

Restenoz, balon anjioplasti tekniği ile tedavi edilen hastaların % 40-50'sinde görülen bir durumdur (33,60-64). Restenoz sebepleri kesin olarak bilinmemekle birlikte birden fazla mekanizmanın rol aldığı bir hücrel iyileşme süreci olarak tanımlanmaktadır ve anjioplasti uygulanan hastalarda ilk altı ay içinde ortaya çıkmaktadır (57). Sonuçta hastaların ikinci bir anjioplastiye hatta ameliyata maruz kalmalarına yol açmaktadır.

Restenoz, damar duvarının balon dilatasyonuna karşı verdiği üç basamaklı bir tepki zinciridir (64). Bu basamaklar akut elastik geri büzülme, intimal hiperplazi ve olumsuz geri şekillenmedir. Elastik geri büzülme, akut gelişen bir olaydır ve şişirilen balonun indirilmesini takiben damar çapında meydana gelen daralma olarak açıklanmaktadır.

Damar içinde şişirilen anjioplasti balonu, damar duvarı yapısındaki düz kas hücrelerinde travmatik bir hasara yol açmaktadır. Bu durum da lokal yaralanmaya karşı trombositlerin, koagülasyonun ve fibrinolitik dizilerin, inflamasyonun, hücre birikiminin ve düz kas hücrelerinin çoğalmasının indüklenmesine ve aktive edilmesine yol açmaktadır. Normalde bu tür bir mekanizma yara iyileşmesinde rol alırken bu durumda açılan damarın tekrar daralmasına yol açan bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Elastik geri büzülme takiben damar duvarının en iç tabakası olan intima tabakasında yer alan düz kas hücreleri aşırı çoğalarak intimal hiperplaziye yol açmakta, sonuçta hücre sayısındaki artış tekrar tıkanmaya yol açacak kadar yüksek oranlara çıkabilmektedir. Restenoz'da görülen diğer bir durum ise olumsuz geri şekillenmedir. Damar duvarının hasar gördüğü bölgede oluşan

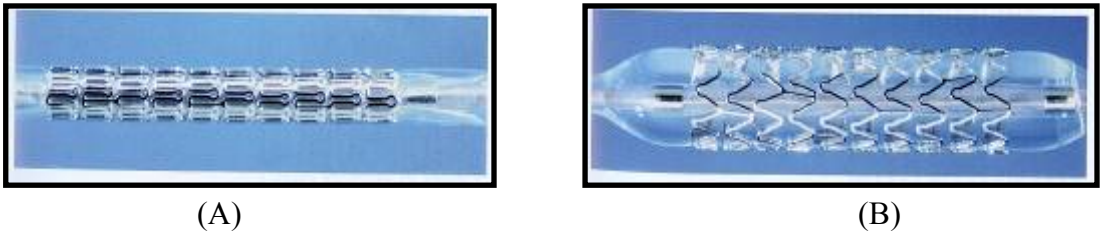
elastik geri büzülme ve düz kas hücrelerinin aşırı çoğalması ile oluşan yeni damar yapısını ifade etmektedir.

Sonuç olarak sistemik ilaç tedavisi ve bypass ameliyatlarına karşı önemli üstünlük sağlamış olan anjioplasti tekniği, restenoz görülme sıklığından dolayı, araştırmacıları bu sorunun üstesinden gelebilecek yeni yaklaşımlar aramaya zorlamıştır.

2.4. Stentler

2.4.1. Stent Tanımı

Stent, genellikle çeşitli metallerden yapılmış, esneme özelliğine sahip, silindirik ağ yapısında medikal cihazlardır (7,47,65). Stent yapısında kullanılan materyaller çoğunlukla 316L paslanmaz çelik, nitinol (nikel ve titanyum karışımı) ve tantalumdur (66). Metalik bir stentin şekli Şekil 2.2’de verilmiştir.



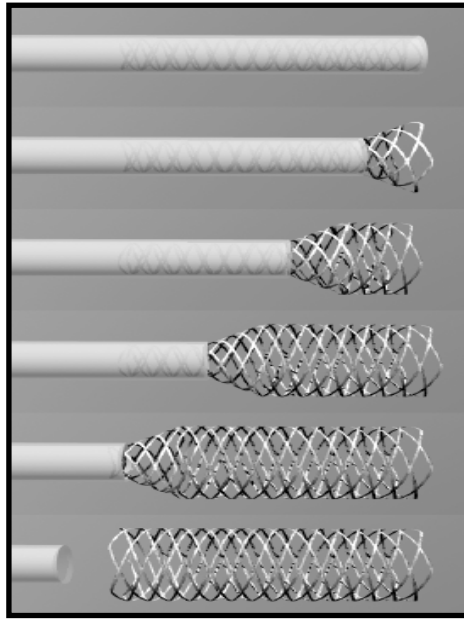
Şekil 2.2. Anjioplasti balonu üzerine sabitlenmiş bir stentin; (A) uygulama öncesi şekli, (B) balonun şişirilmesi ile açık şekli

2.4.2. Stentlerin Uygulanmaları

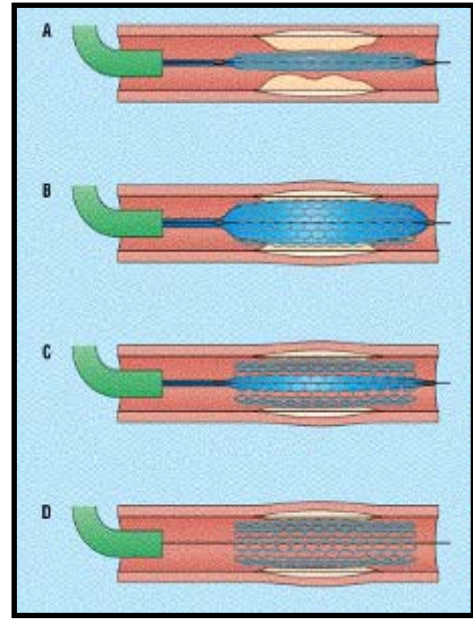
1990’lı yıllarda stentlerin geliştirilmesi ile birlikte anjioplasti uygulamalarında yeni bir adım atılmıştır. Stent kullanımı, stenoz tedavisi için kabul gören bir teknik olmuş ve anjioplasti uygulamalarının % 80’inde uygulanır duruma gelmiştir (50).

Stentler farklı özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Öncelikli sınıflandırma stentlerin uygulama sistemine göre yapılabilir. Bu sınıflandırmaya göre stentler; (i) Kendinden açılma özelliğine sahip olan stentler (self-expandable stents), (ii) Balon ile açılan stentler (balloon expandable stents) (47) olarak iki grup altında incelenirler.

Kendinden açılma özelliğine sahip olan stentler söz konusu olduğunda, kataterin ucunda kapalı konumda bulunan stentin üzerinde bir kılıf bulunur. Daralmanın olduğu bölgede, bu kılıf stentin üzerinden çekilir ve stent kendiliğinden açılarak plak yapısını damarın kenarlarına doğru sıkıştırır (Şekil 2.3A). Balon ile açılan stentlerde ise kataterin ucundaki anjioplasti balonunun üzerine kapalı konumda bulunan stent sabitlenmiştir. Daralmanın olduğu bölgede balon şişirilir ve balon ile birlikte üzerindeki stent de açılmış olur. Balon indirilerek katater çekilir. Böylece stent uygulandığı bölgede kalmaya devam eder (Şekil 2.3B)(47, 49).



(A)



(B)

Şekil 2.3. Stent uygulamaları (67).

Tablo 2.2’de günümüzde ticari olarak kullanımda olan stentler, üretici firmaları ve üretildikleri materyaller ile ilgili bilgiler yer almaktadır.

Tablo 2.2. Ticari olarak kullanımda olan stentler (47,64)

Ticari İsim	Üretici Firma	Üretildiği Materyal
BeStent 2	Medtronic AVE, ABD	316L paslanmaz çelik
BiodivYsio AS, OC ve SV	Biocompatibles, İngiltere	316L paslanmaz çelik
Bx Velocity	Cordis/J&J, ABD	316L paslanmaz çelik
Carbostent SIRIUS	Sorin Biomedica, İtalya	316L paslanmaz çelik
Corydynamic Apolo	Iberhospitex, İspanya	316L paslanmaz çelik
Coroflex ve Coroflex Delta	Braun Melsungen, Almanya	316L paslanmaz çelik
Duraflex	Avantec Vascular Corp., ABD	316L paslanmaz çelik
Express	Boston Scientific, ABD	316L paslanmaz çelik
Genic SV, LV ve DYLN	Blue Medical Devices, Hollanda	316L paslanmaz çelik
Genius	EuroCor Interventional, Almanya	316L paslanmaz çelik
Igaki-Tamai	Igaki Medical Planning, Japonya	PLLA (Poli Laktik Asit)
JOSTENT	Jomed, İsveç	316L paslanmaz çelik
Med-X Flexy Stent	Med-Xcor, Fransa	316L paslanmaz çelik
Nexus ve Nexus II	Occam International BV, Hollanda	316L paslanmaz çelik
NIR	Medinol/SciMed Life Systems, İsrail	316L paslanmaz çelik (altın kaplanmış)
Prolink	Vascular Concepts Ltd, İngiltere	316L paslanmaz çelik
Rithron	Biotronik GmbH, Almanya	316L paslanmaz çelik (silikon carbide ile kaplı)

2.4.3. Stentlerin Üstünlükleri ve Sakıncaları

Stentlerin metalik ağ yapısı, oluşan plak yapılarını damarın kenarlarına doğru iterek damarı açmakta; uygulama yerinde kalmaya devam ederek damar için bir destek yapısı oluşturmaktadır. Bu destek yapısı sayesinde, stentler balon anjioplastisinde görülen akut elastik geri büzülme ve olumsuz geri şekillenmenin

önüne geçmiş olur (30,50,68). Uygulama yerinde kalan stent yapısı damarın tekrar büzülmesini engeller ve restenozun görülme olasılığını azaltır. Koroner stentlerin kullanımı ile balon anjioplastisinde görülen % 50 ve daha yüksek restenoz olasılığı düşürülmüştür (35,60,63,69).

Stentlerin balon ile gerçekleştirilen anjioplasti uygulamalarına klinik çalışmalarla gösterilen üstünlüklerine karşılık (64), operasyonu takip eden ilk altı ay içinde stent takılan hastaların %10-40'ı arasında restenoz görülmeye devam etmektedir (64). Stentlerin yerleştirildikleri bölgede meydana gelen restenoz olayına özel olarak stent-içi restenoz adı verilmektedir (11). Stent-içi restenoz birincil olarak intimal hiperplaziden kaynaklanmaktadır (11,47,65). Stent açılırken damar duvarında bir yaralanma meydana getirmektedir. Bu yaralanma da restenoz mekanizmalarını aktive etmektedir. Ayrıca stentin metalik kenarları da makrofajları ve düz kas hücrelerini uyarmakta bütün bunların sonucunda intimada aşırı düz kas hücresi çoğalması (intimal hiperplazi), balon anjioplastisine oranla daha hızlı ve yüksek oranda olmaktadır. Bu hücreler bir süre sonra stent yapısını da içine alarak damarı tekrar tıkamaktadırlar (11,32,35,57). Buna göre stentler, restenoz mekanizmalarını mekanik olarak engellemekle birlikte hücresel düzeydeki oluşumlar üzerinde etkisiz kalmaktadırlar. Ayrıca stent yerleştirilmesini takip eden ilk 30 gün içinde trombozis oluşumu riski, düzenli ilaç kullanımını zorunlu hale getirmektedir (70).

Stent ile yapılan perkütan koroner anjioplastilerde dikkatli olunması gereken bir diğer konu da stent yapılarının tasarımı ve fiziksel özellikleridir (64,70). Çoğu metal yüzeyi elektrostatik olarak pozitif yüklüdür. Kan elemanlarının büyük bir oranı negatif yüzey yükü taşıdığından tromboz oluşumuna yol açabilmektedir (65). Ayrıca stent yapısında kullanılan metallere bağlı olarak stentlerin kenarlarının kalın olması, mekanik dirence dolayısı ile iyi bir arteriyel desteğe sahip olmalarını sağlamakta ancak damar duvarı hasarına yol açmaktadır (18).

Balon ve stent kullanılarak gerçekleştirilen anjioplasti uygulamaları sonucunda görülen restenoz ve stent-içi restenozun tedavisi için farklı yaklaşımlar denenmiştir (57,63,70). Restenozun görüldüğü bölgeye tekrar anjioplasti ya da stent

uygulanması gerçekleştirilmektedir (57). Fakat uzun dönemde tekrar restenoz görülme olasılığı bulunmaktadır. Stent-içi restenozun önlenmesinde bir diğer yaklaşım ise brakiterapi olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntemde restenozun görüldüğü damar içi bölgeye özel bir katater yardımıyla kısa süreli (yaklaşık 5 dakika) gama ya da beta radyasyonu uygulanmaktadır. Uzun vadede tromboz oluşumuna yol açması ve olumsuz geri şekillenme oranını artırma olasılığı kullanımını sınırlamaktadır (71).

Restenoz tedavisi amacıyla sistemik ilaç kullanımı da uygulanan tedavi yaklaşımları arasındadır (57,70,72). Kullanılan ilaçlar ve kullanım amaçları aşağıda örneklerle verilmiştir;

Antitrombosit ve antitrombotik ilaçlar: Restenoz oluşumundaki ana basamaklardan olan trombosit birikmesi ve yığılmasını engelleyerek restenozu tedavi etmek için (Örn. varfarin, aspirin, heparin).

Antiinflatuvar ilaçlar: Restenoz oluşumu sırasındaki inflamatuvar cevabı ve buna bağlı olarak hücre çoğalmasını engellemek için (Örn. dexamethasone (73,74), prednisolone, tranilast)

Spesifik büyüme faktörü antagonistleri: Restenoz oluşumu sırasında salınan ve düz kas hücrelerini uyararak daha hızlı çoğalmalarına yol açan büyüme faktörlerini inhibe etmek için (Örn. trapidil, anjipteptin).

Antineoplastik ilaçlar: Spesifik olmayan antineoplastik etkin maddeler kullanılarak restenozda görülen son basamak olan düz kas hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmek için (Örn. paklitaksel, rapamisin) (57).

Yukarıda verilen ilaçların restenoz tedavisi için sistemik uygulanmaları klinik olarak restenozun önüne geçmekte yetersiz olmuştur (34,57,60,64,69,70). Sistemik uygulama ile restenozun görüldüğü bölgeye yetersiz konsantrasyonda etkin madde ulaşması ve klinik olarak etki gösterecek dozların sistemik toksisiteye yol açması sistemik ilaç uygulamasının restenoz tedavisinde etkisiz kalmasına yol açmıştır (75).

2.5. İlaç Salan Stentler (DES-Drug Eluting Stents)

2.5.1. İlaç Salan Stentlerin Gelişimi ve Kullanımı

Anjioplasti uygulamaları sonucunda görülen restenozun önlenmesi için geliştirilen tekniklerin istenen sonuçları vermemesi ve sistemik ilaç uygulamalarının yetersiz kalışı, ilaçların damar yapısı içine lokal olarak uygulanması gerekliliğini ortaya çıkartmıştır (11,26,68,73,75,76).

Ateroskleroz görülen bölgeye lokal olarak ilaç taşınmasının üstünlükleri şu şekilde sıralanabilir (11,34,64,75);

- ▲ İlaçların sistemik toksisite göstermelerine yol açabilecek aşırı dozlarının kullanılmasını engellemek,
- ▲ İlk geçiş etkisinden kurtularak olası metabolizasyonlardan kaçınmak,
- ▲ İlaçların etki gösterecekleri konsantrasyonlarda uygulama bölgesine ulaşmalarını sağlamak.

Lokal olarak ilaç taşınması için öncelikle katater temelli yaklaşımlar denenmiştir. Anjioplasti balonu üzerine sabitlenen etkin madde daralmanın görüldüğü bölgede, balonunun şişirilmesini takiben damarın iç tabakasına uygulanmış olmaktadır (71,75). Fakat bu uygulama sonucunda etkin madde çok kısa bir süre boyunca damarla temas edebilmekte, katater uzaklaştığı anda etkin maddenin etki yeri ile teması bitmektedir. Kataterin ucundaki balon şişirildiğinde damarı tamamen kapatmakta bu durum da kan akışını engellemektedir. Bu sebeplerden dolayı uygulanan etkin madde hızla kan dolaşımına karışmakta ve istenen süre etkisini gösterememektedir (64,75).

Katater temelli ilaç taşınmasının insan çalışmalarında stenozin engellenmesinde önemli bir etki gösterememeleri, lokal ilaç taşınması için stentlerin uygun platform olduğunu göstermiştir (34). Stent uygulaması ile elde edilen mekanik etkinin tek başına restenozu engellemede başarısız oluşu, farklı yollarla ilaç uygulanmasının restenoz üzerinde istenen etkiyi göstermemesi bu iki tedavi

stratejisinin birleştirilerek ilaç salan stentlerin geliştirilmelerini sağlamıştır (75). Stentlerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılması ile temel olarak iki yönlü bir etki elde edilir. İlaç salan stentler, mekanik destek görevi gören yapıları ile restenoz mekanizmaları olan elastik geri büzülme ve olumsuz geri şekillenmeyi mekanik olarak engellemekte, aynı zamanda bir taşıyıcı görevi üstlendiği etkin maddenin lokal olarak salınmasını sağlayarak intimal hiperplazinin önüne geçmektedirler (50). Ayrıca stentlerin uygulandıkları bölgede uzun süre boyunca kalmaları, damar duvarına, uzatılmış ve kontrollü etkin madde salımına izin verir (75).

İlaç salan stentlerin geliştirilmesi için zaman içinde farklı yaklaşımlar denenmiştir. Bu amaçla etkin madde içermeyen metalik yapıdaki stentler, ilaç çözeltisinin içine daldırılarak ya da ilaç çözeltisi stent üzerine püskürtülerek kaplanabilir (11,70). Etkin maddenin, bu şekilde direkt olarak stentin yüzeyine sabitlenmesi mümkün iken, matriks görevi gören polimerik bir kaplama materyali içinde dağıtılarak stentlerin kaplanması ile de ilaç salan stent sistemleri oluşturulabilir (70,77).

İlaç salan stent yapıları üç bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; ilaç, polimerik matriks ve stenttir (60). Bu üç bileşen ve taşınması gereken özellikler ayrıntılı olarak aşağıdaki bölümlerde sunulacaktır.

2.5.1.1. İlaç

İlaç salan stentlerin yapısına giren bir etkin madde restenoza yol açan hücresel yanıtlardan intimal hiperplaziye inhibe edecek özellikte olmalıdır (11,49,60). Bu amaçla ilaç salan stentlerin bileşimine giren farmakolojik gruplara örnek olarak antiinflamatuvarlar (deksametazon, metil prednizolon, tranilast), immunosupresifler (sirolimus, takrolimus, mikofenolik asit) ve antiproliferatifler (paklitaksel, tirozin kinaz inhibitörü, C-myc antisens oligonükleotiti) verilebilir (11,49).

2.5.1.2. Polimer Matrisi

İlaç salan stentlerin yapısına giren birçok ilaç, stentlerin metalik yüzeyine sabitlenemediği için bir polimer tabakasına ihtiyaç duyulmaktadır (60). Etkin bir polimer kaplaması;

- Stentlerin kullanımı sırasında ortaya çıkan mekanik zorlanmalara karşı koyabilmeli (70),
- Trombojenik olmamalı (11),
- Damar duvarında tek başına bir inflamatuvar cevap oluşumuna yol açmamalı (34),
- Etkin maddenin intimal hiperplaziyi inhibe edebilmesi için en az 3 hafta kontrollü olarak salımını sağlayabilmelidir (11,34).

Kaplama amacıyla kullanılan polimerlerden bazıları ve etkin maddeler Tablo 2.3’de verilmiştir (75). Bu polimerlerden biyoparçalanır yapıda olan, PLGA, Poli(L-laktid) (PLLA) ve Poli(kaprolakton) (PCL) salım özelliklerinin ayarlanabilmesi, biyoparçalanır özellikte olmaları ve iyi mekanik özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir.

Tablo 2.3. Literatürde yer alan ilaç salan stent çalışmaları

Polimer/Lipid	Etkin Madde	Literatür
PLLA	Dexamethasone	73
PLLA	Hirudin	78
Fosfatidil kolin	Dexamethasone	74
Polietilen tereftalat	Heparin	21
Kollajen	Sirolimus	50
Akrilik Asit	Estrojen	62
PLGA	Paklitaksel	79
PLGA	Metalloproteinaz	80
Polilaktid-ko-kaprolakton	Paklitaksel	81
Poliorganofosfazen	Metilprednizolon	82
Poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene)	Paklitaksel	77

2.5.1.3. Stent

İdeal bir ilaç salan stent, esnek ve büyük bir yüzey alanına sahip olmalıdır. Ayrıca mekanik dayanıklılığının da yüksek olması gerekmektedir (60). Piyasada yer alan ilaç salan stent sistemlerinde kullanılan stentler, özellikle ilaç salımı için geliştirilmemiş, konvansiyonel stentlerdir.

İnsanlarda kullanım izni alarak piyasaya sürülmüş olan iki adet stent bulunmaktadır. FDA'den onay alan bu stentlerden birincisi 2003 Nisan ayında piyasaya sürülen Cordis firmasının CYPHER™ sirolimus salan stenti diğeri de Boston Scientific firmasının 2004 Mart'ında piyasaya sürülen TAXUS™ paklitaksel salan stentidir. Paklitaksel sitotoksik etkisinden dolayı tümörlere karşı kullanılan bir ilaçtır (83). Lokal olarak hücre yapısındaki mikrotübüllerin yapısını bozarak, hücre çoğalmasını önlemektedir. Böylece stentin yerleştirildiği bölgede hücresel olarak restenoz engellenmektedir. CYPHER stentinin etkin maddesi olan sirolimus ise immunosupresan ve antiproliferatif etkisi nedeniyle kullanılan antibiyotik yapıda bir bileşiktir. Sirolimus, damar duvarında yer alan düz kas hücrelerinin ve endotel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği anlaşıldıktan sonra ilaç salan stentlerde kullanılmaya başlanmıştır (11).

2.5.2. İlaç Salan Stentlerden İlaç Salımı

İlaç salan stentlerden lokal olarak ilaç salımını etkileyen etkenler (57);

- ▲ Kaplamanın kalınlığı
- ▲ İlacın ve polimerin fizikokimyasal özellikleri
- ▲ Polimer matriksinin gözenekliliği
- ▲ Stentin tasarım özellikleri
- ▲ Stentlerin içerdiği etkin madde miktarı olarak özetlenebilir.

Etkin maddenin özellikleri ele alındığında, hidrofobik ilaçların damar duvarına geçmesi daha kolay olmaktadır (84). İlaçların stentin üzerindeki kaplamadan salımları genellikle difüzyon ya da çözünme/degradasyon kontrollü

olarak gerçekleşmektedir (85). İlaç salan stentlerden salımın difüzyon ya da çözünme/degradasyon kontrollü mekanizmalarından hangisine göre gerçekleşeceği kaplama için seçilen polimerin özelliklerine bağlı olarak kontrol edilebilmektedir.

Difüzyon kontrollü sistemlerde ilaç salımı suda çözünmeyen polimerler ile sağlanır. Piyasada kullanımda olan CYPHER ve TAXUS stentlerinin her ikisinde de suda çözünmeyen polimerler kullanılmakta ve buna bağlı olarak ilaç salımı difüzyon kontrollü olmaktadır. Çözünme/Degradasyon kontrollü sistemlerde ise ilacın salınması suda çözünebilir polimerin yavaşça çözünmesine ya da hidrofobik polimerlerin yavaş bir şekilde degrade olmasına bağlıdır (85).

2.5.3. İlaç Salan Stentlerin Üstünlük ve Sakıncaları

Yapılan klinik çalışmalar restenozun engellenmesinde ilk altı aylık sürenin son derece kritik olduğunu göstermektedir ve bu süreden sonra kalıcı bir desteğe olan ihtiyaç gittikçe azalmaktadır. Bu süre zarfında restenozun mekanik ve hücresel düzeyde engellenmesi mümkün olursa bundan sonraki zaman dilimlerinde restenoz görülme olasılığı ortadan kalkmaktadır (31,36,61,65,86). İlaç salan stentler iki mekanizmayla restenozu engellemekte fakat görevlerini yerine getirdikten sonra vücutta gereksiz yere uzun süre kalmaktadırlar. Stentlerin sadece son 10 yıldır yaygın olarak kullanıldıkları düşünüldüğünde, uzun süreli etkileri ve görülebilecek yan etkiler açısından beklenmedik sonuçlar doğurabilecekleri gözönünde bulundurulmalıdır (35,60).

2.6. Biyoparçalanır Stentler

Bu bölümde, tezimizde formülasyon geliştirme çalışmaları gerçekleştirilen biyoparçalanır stentlerle ilgili ayrıntılı bilgiler verilmeden önce, biyoparçalanır stentlerin üretiminde sıklıkla kullanılan polimerler hakkında kısa bir bilgi verilecektir.

2.6.1. Poli laktid (PLA), Poli glikolid (PGA) ve Poli laktid-ko-glikolid (PLGA)

PLA, PGA ve bu polimerlerin kopolimeri olan PLGA üzerinde en çok çalışma yapılan ve ticari olarak en çok kullanılan poli(α -hidroksi asit) grubuna dahil biyoparçalanır polimerlerdir (7,87).

PGA ve PLA polimerlerinin farklı oranlarda bir araya gelmesiyle sentezlenen kopolimerler ise PLGA olarak adlandırılır. İçerdikleri PLA ve PGA monopolimerleri oranlarının değiştirilmesiyle kopolimerin biyolojik ortamda parçalanma süresinin ayarlanabilmesi önemli yer tutmaktadır. Böylece PLGA kullanılarak hazırlanan implant ve ilaç taşıyıcı sistemlerin içerdikleri etkin maddeyi salım süreleri ve vücutta kalış süreleri optimize edilebilmektedir (1). PLGA kopolimerlerinin mekanik özelliklerinin iyi oluşu ve FDA tarafından insanlar üzerinde kullanımlarına izin verilmiş oluşu bu polimerlerin tercih edilirliliğini artırmaktadır.

Tez çalışmamız kapsamında metalik stentlerin kaplanması ve biyoparçalanır stentlerin hazırlanması amacıyla PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) kopolimerleri kullanılmıştır.

2.6.2. Biyoparçalanır Stentlerin Gelişimi ve Kullanımları

Koroner anjioplasti uygulamalarında izlenen stratejiler ve polimer teknolojisindeki gelişmeler ateroskleroz tedavisinde biyoparçalanır stentlerin kullanımını da beraberinde getirmiştir. İlaç salan stentlerin restenozun görülme sıklığını düşürmedeki başarılarına rağmen (11,88), stenlerdeki polimer tabakasının kalınlığının sınırlı oluşu yüklenecek ilaç miktarını azaltmakta ayrıca etkin maddenin kontrollü salımının sağlanmasında güçlük oluşturmaktadır (88).

İlaç salan stentlerin elastik geri büzülme ve olumsuz geri şekillenme mekanizmalarını mekanik olarak engellemeleri ve intimal hiperplaziyi hücresel boyutta inhibe etmeleri amaçlanan kullanımlarıdır. Ancak metalik ilaç salan stentler

istenen bu amaçları yerine getirdikten sonra vücut içinde gerek duyulmadığı halde kalmaya devam etmektedirler.

Bu olumsuzluklardan, biyoparçalanır stentlerin geliştirilmesi ile kaçınmak bir alternatif oluşturmuştur. Biyoparçalanır polimerler kullanılarak üretilen bu stentler damar içinde ihtiyaç duyulan süre boyunca mekanik olarak destek görevlerini yapmakta ayrıca içerdikleri etkin maddeler aracılığı ile hücrel olarak restenoza yol açan mekanizmaları inhibe etmektedir. İlaç salan stentlerden farklı olarak da görevlerini yerine getirdikten sonra hiç bir toksik bileşen bırakmadan organizma içinde absorbe olmaktadır (76,89). Böylece vücut içinde ihtiyaç olmayan süreler boyunca yabancı bir cisim bırakılmamış, stentlerin metalik yapılarının yol açabileceği inflamasyonlardan kaçınılmış, ikinci bir operasyon olasılığı da engellenmiş olmaktadır.

2.6.3. Biyoparçalanır Stentlerin Üstünlük ve Sakıncaları

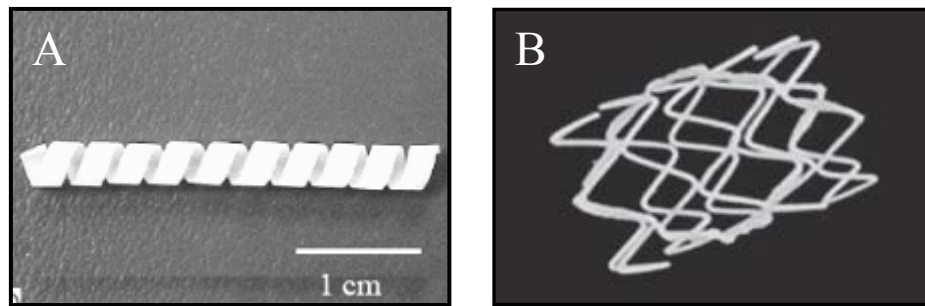
İdeal bir stentte bulunması gereken özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir (86,90):

- ▲ Amacını gerçekleştirdikten sonra biyoparçalanır olmalı ve parçalanma ürünleri toksisite göstermemeli,
- ▲ Mekanik fonksiyonunu sağlaması için fiziksel olarak zorlamalara karşı dayanıklı olmalı,
- ▲ Anjioplasti süresince kolay uygulanabilmesi için yeterli esnekliğe sahip olmalı ve
- ▲ Restenozu engellemek için lokal olarak kontrollü etkin madde salımını sağlayabilmelidir

Bu istenen özelliklere ulaşmak ancak uygun biyoparçalanır stentlerin geliştirilmesi ile mümkün görünmektedir (90). Biyoparçalanır stentlerin polimerik kenar yapıları damarla temas yerlerinde daha az hasar yaratmakta bu da damar duvarında oluşan yaralanmayı azaltarak hücrel cevabın daha az olmasını sağlamaktadır (36,65). Ayrıca ilaç kaplı stentlerden farklı olarak bütün bir stent

yapısının polimerden oluşması, stente yüklenecek etkin madde miktarının kontrollü ilaç salımı sağlayacak uygun miktarda olmasını sağlamakta bu durumda da etkin maddenin kontrollü olarak salımı elde edilebilmektedir (88).

Biyoparçalanır stentlerde farklı şekilsel özelliklere sahip stent yapıları geliştirilmiştir (31,36,65,90-92). Bu yapıların içinde helikal yapıda hazırlanan (Şekil 2.4-A) (90) stentler olduğu gibi mikrofilament yapısında stentler de (31, Şekil 2.4-B) bulunmaktadır.



Şekil 2.4. Stent Yapıları. A: Helikal Yapı (90) B: Mikrofilament yapı (31)

Hietala ve diğ. (92) PLA kullanarak biyoparçalanır, spiral yapıda stent geliştirmişlerdir. Stent yapısı onikinci aydan itibaren hidroliz olmaya başlamış ve yirmidördüncü ayda büyük oranda parçalanmış ve bu süreç içerisinde stent restenozu engellemiştir. Igaki ve Tamai (31) PLLA polimeri kullanarak zig-zag yapılı (Şekil 2.4B) biyoparçalanır stent üretmişlerdir. Metalik stentlere kıyasla damar duvarında daha az intimal hiperplazi görülmüş ve altı ay süresince restenoz oranı % 10,5 olarak bulunmuştur. Igaki-Tamai stenti herhangi bir inflamasyona ya da tromboz oluşumuna yol açmamıştır. Ayrıca Yamawaki ve diğ. (61) Igaki-Tamai stentine tirozin-kinaz inhibitörü yüklemişler ve yirmi birinci günün sonunda önemli derecede azalmış intimal hiperplazi gözlemlemişlerdir. Igaki-Tamai stentine antiproliferatif bir ilaç olan tranilast yüklenmiş ve tranilast ile kaplanmış metalik stentlere göre ilacın yüklenme miktarını yüksek bulmuşlardır (31).

Yamawaki ve diğ. (61) Igaki-Tamai stentine etkin madde olarak tirozin kinaz inhibitörü yükleyerek yaptıkları çalışmada PLLA'nın çok az bir lokal inflamasyona yol açtığını göstermişlerdir. Ayrıca stent yapısı mekanik olarak restenozun oluşumunu engellemiştir.

Nuutinen ve diğ. (36) PLLA kullanarak ağ yapısında biyoparçalanır stent formülasyonu geliştirmişlerdir. Stentin 3 mm'den dar arterlere uygulanabileceğini belirtmişlerdir. Stentin başlangıçtaki mekanik dayanıklılığının % 50'sini kaybetmesi için 30 hafta geçmesi gerektiği sonucunu elde etmişlerdir.

Valimaa ve diğ. ise (91) PLGA (80:20) kopolimeri kullanarak kendinden açılabilen biyoparçalanır bir stent tasarımı gerçekleştirmişlerdir. İn vitro ortamda stentlerin sertliklerini önemli ölçüde kaybetmeleri için dokuz hafta geçmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Venkatraman ve diğ. (90) PLLA kullanarak helikal yapıda biyoparçalanır stent üretmişler (Şekil 2.4A) ve in vitro ortamda ilaç yüklemesinin stentin mekanik özellikleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Yüksek oranda ilaç yüklemesinin, stent yapısının parçalanması için gereken zorlamayı artırdığı ve stentin fiziksel yapısını altı ay boyunca koruduğu sonucunu bulmuşlardır.

Vogt ve diğ. (93) PLLA kullanarak helikal yapıda stent geliştirmişler, stente paklitaksel yükleyerek in vivo olarak değerlendirmişlerdir. İn vitro ortamda ilacın üç ay içinde tamamen ortama salındığını belirtmişlerdir. Etkin madde içermeyen polimerik stentlerin metalik stentlere göre daha fazla restenoza yol açtığını fakat paklitaksel içeren stentlerde bu oranın her iki gruba oranla az olduğunu bulmuşlardır.

Yoon ve diğ. de (94) PLGA (75:25) kopolimeri kullanarak biyoparçalanır damar iskeletleri geliştirmiş ve bu yapılara doksametazon yüklemişlerdir. Etkin maddenin 30 gün içinde polimer yapılarından in vitro ortamda salındığı ve düz kas hücreleri üzerinde antiinflamatuvar etkisine bağlı olarak çoğalmayı engellediği gösterilmiştir.

Biyoparçalanır stentler koroner anjioplasti konusunda araştırmaların getirdiği önemli bir nokta olmasına rağmen klinik kullanımda tespit edilen sakıncaları da bulunmaktadır. Bunlar arasında kullanılan polimerin fiziksel olarak yeterli dayanıklılık göstermesi önemli sorunlardan biridir. Mekanik özellikleri istenen

düzeyde olmayan bir polimerin kullanılması uygulama sırasında polimer yapısında kırılma ve kopmalara yol açabilir. Bu durumda meydana gelebilecek emboli hastanın ölümüne yol açabilir. Ayrıca polimerlerin kendilerine özgü plastik özelliklerinden dolayı polimerik stentlerin balon ile şişirilmelerini takiben tekrar daralma eğilimi göstermeleri damarın yeterli ölçüde açılmamasına yol açabilir. Igaki – Tamai stenti damar içine yerleştirildikten sonra balon ile açılma işlemine ek olarak tekrar daralmanın meydana gelmemesi için katater yardımıyla 70 °C'ye kadar ısıtılmaktadır. Bu durum lokal olarak uygulama yerindeki hücrelerde ilave bir hasara yol açabilmektedir (36,89,95). Bu sorunun çözümü için kendiliğinden şişme özelliği gösteren polimerik stentler geliştirilmiştir (89,95).

Biyoparçalanır polimerik stentlerde, tüm bu sözü edilen sakıncalara ve tasarım ve kullanımda düşünülmesi gereken konulara dikkat edildiği takdirde, bu sistemlerin koroner arter hastalığının tedavisinde uzun yıllar üstünlüklerini koruyabilecekleri anlaşılmaktadır.

2.7. Mikroküreler

2.7.1. Mikrokürelerin Özellikleri

Mikroküreler, çapları 1 µm ile bir kaç yüz mikrometre arasında değişen, monolitik yapıda, etkin maddeleri vücut içinde belirli bölgelere taşıyabilme potansiyeline sahip olan, katı, küresel mikrotasıyıcı sistemlerdir (8).

Mikroküre sistemlerinden beklenen özellikler; etkin maddeyi kontrollü olarak salması, biyouyumlu olması, düşük dozlarda etkin madde kullanımına olanak vermesi ve buna bağlı olarak toksisiteyi azaltması, biyoparçalanır olması ve parçalanma ürünlerinin toksik özellik göstermemesi, etkin maddenin özelliklerini olumsuz yönde etkilememesi ve etkin maddenin stabilitesini koruyabilmesidir (8).

2.7.2. Mikroküre Hazırlamada Kullanılan Polimerler

Mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan polimerleri doğal ve sentetik polimerler olarak ayırmak mümkündür. Doğal polimerler biyoparçalanır olmaları, organizma için toksik bir bileşen oluşturmamaları ve suda çözünebilen etkin maddeler için uygun taşıyıcılar olmaları gibi özellikleri ile tercih edilirler (96). Sentetik polimerler ise kendi içlerinde biyoparçalanır olan ve olmayan olarak ayrılırlar. İstenen özelliklere göre sentez edilebilmeleri, büyük ölçekli üretimlerinin yapılabilmesi, hazırlama ve saklama süresince dayanıklı olmaları ve yüksek saflıkta üretilibilmeleri gibi özellikler ile tercih edilen polimerlerdir (8,96).

Tez çalışmamızda prednizolon asetat yüklü mikrokürelerin hazırlanmasında doğal bir polimer olan kitosan kullanılmıştır. Bu nedenle kitosan ve kitosan kullanılarak hazırlanan mikroküreler ayrıntılı olarak verilmiştir.

2.7.3. Kitosan ve Kitosan Kullanılarak Hazırlanan Mikroküreler

Kitosan, *Crustacea* kabuklarında bulunan kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen glukozamin ve N-asetilglukozamin kopolimeri olan bir polisakkarittir. Serbest amino grupları ise pozitif bir yük taşımalarını sağlamaktadır (97,98).

Kitosan polimerleri, farklı molekül ağırlığına, viskoziteye ve deasetilasyon derecesine sahip olabilir (97,98). Kitosan polimerinin vücut ile uyumlu, biyoparçalanır, düşük toksisiteye sahip oluşu en önemli özellikleri olarak bildirilmektedir (99-101). Kitosan polimeri farmasötik teknoloji alanında; tablet formülasyonlarında (97), mikropartiküler taşıyıcı sistemlerde (99,101-103) ve implante edilebilen sistemler gibi (104) sistemlerde kullanılmaktadır.

2.7.4. Kitosan Polimeri ile Mikroküre Hazırlama Yöntemleri

Kitosan mikrokürelerinin hazırlanması için pek çok farklı yöntem bulunmaktadır (98,103,105-107). Bu yöntemlerden hangisinin seçileceği istenen

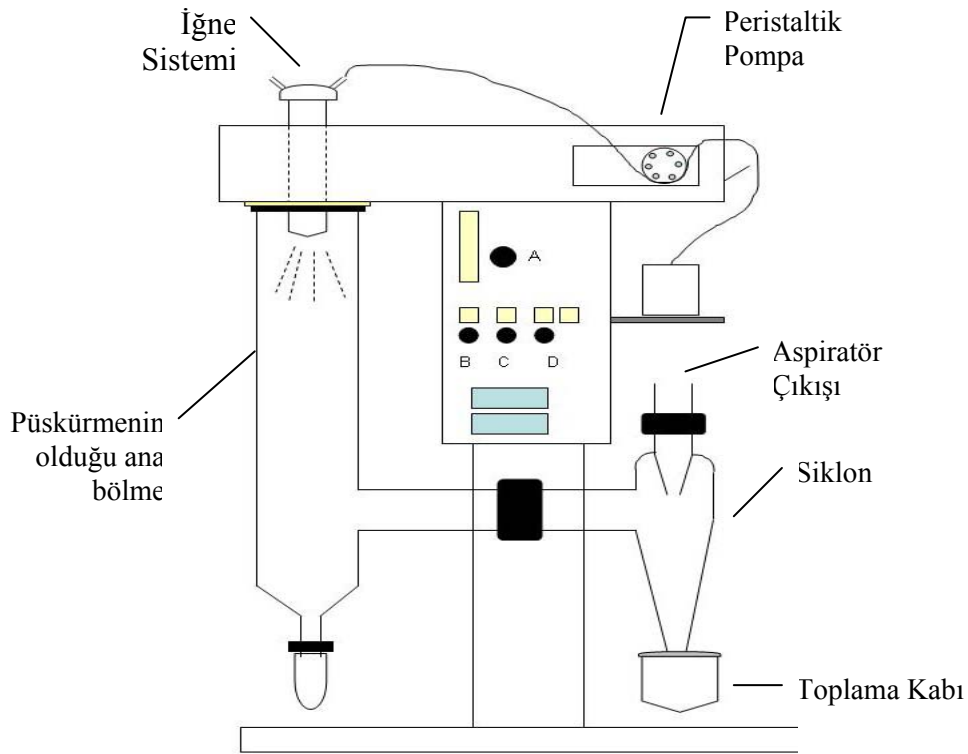
partikül büyüklüğüne, son ürünün stabilitesine, üretim sonrasında ortamda kalabilecek toksik bileşenlere ve etkin maddenin termal özelliklerine göre değişmektedir (103). Emülsifikasyon ve ionotropik jelasyon, koaservasyon ve çöktürme, iyonik jelasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemleri kitosan mikrokürelerinin hazırlanması amacıyla kullanılmaktadır. Bu bölümde kitosan mikroküre sistemleri hazırlanması için tez çalışmamızda kullanılan püskürterek kurutma yöntemi ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

2.7.4.1. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma yöntemi ilaç-yardımcı madde çözeltisi ya da süspansiyonlarından kuru tozların, granüllerin ve aglomeratların elde edilmesi için kullanılan bir yöntem olmuştur (108). Püskürterek kurutma yöntemi özellikle gıda ve ilaç sanayinde önemli kullanım alanı bulmuştur (109). Son yıllarda, püskürterek kurutma yöntemi yüksek üretim verimi sağlaması, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntem oluşu ve organik çözücü kullanımını gerektirmemesi gibi nedenlerle mikroküre hazırlanması için de sık olarak kullanılmaya başlanmıştır (110,111). Yöntem atomize hale getirilen damlacıkların sıcak hava akımı içerisinde kurutulması esasına dayanmaktadır (103). Bu amaçla geliştirilen püskürterek kurutucu cihazları sayesinde farmasötik teknolojide büyük önemi olan mikroküre formülasyonlarının hazırlanması sağlanmıştır.

Püskürterek kurutma yönteminde mikrokürelerin üretilmesi için hazırlanan polimer ve etkin madde içeren çözelti silikon bir boru yardımı ile iğnenin çözelti besleme girişine bağlanır. Peristaltik pompa yardımı ile çözeltiye vakum uygulanır ve çözelti boru içinde ilerleyerek iğneye ulaşır. İğnenin diğer besleme ucundan ise basınçlı hava (genellikle 5 – 8 bar arası) sisteme giriş yapmaktadır. Polimer çözeltisi iğnenin ucundan basınçlı havanın yardımıyla ana bölümün içine püskürtülür. Püskürterek kurutucu cihazı püskürtmenin olduğu ana bölmeye sıcak hava akışı sağladığından, sıcaklığa bağlı olarak polimer çözeltisi damlacıklarındaki çözücü buharlaşır. Böylece katı hale gelen partiküller siklona doğru ilerlerler. Burada siklonun özel yapısı sayesinde altta bulunan örnek kabına inerler. Siklonun üst

çıkışından uygulanan vakum ise ana bölmeden siklona ulaşan çözücü buharlarını katı partiküllerden ayırmak ve ortamdan uzaklaştırmak içindir. Elde edilen mikroküreler kurutulmuş olduğu için ilave bir işlem yapılmasına gerek kalmadan uygun örnek kaplarına alınabilirler. Tez çalışmamızda kullanılan püskürterek kurutma cihazının şematik gösterimi Şekil 2.5’de sunulmuştur.



Şekil 2.5. Çalışmalarımızda kullanılan püskürterek kurutucunun (Büchi 190 Mini Spray Dryer) şematik gösterimi (A: Hava akış hızı kontrol düğmesi, B: Pompa hızı ayarlama düğmesi, C: Aspiratör seviyesi ayarlama düğmesi, D: Sıcaklık ayar düğmesi, E: Giriş sıcaklığı göstergesi, F: Çıkış sıcaklığı göstergesi)

Püskürterek kurutma yönteminde elde edilen mikropartiküller küresel yapıdadırlar (112). Elde edilen mikrokürelerin boyutları bir kaç mikrometreden yaklaşık yüz mikrometreye kadar çıkabilir (110). Bu yöntemde son ürünün özellikleri üzerinde etkili olan bir çok değişken vardır. Mikrokürelerin partikül büyüklükleri

üzerinde; püskürtme hızı, püskürtmenin yapıldığı iğne ucu açıklığı ve kurutma hızının etkisi vardır. Bununla beraber elde edilen kürelerin ortalama çapları 10 μm 'den daha düşük olmaktadır (101,105,112,113).

Püskürterek kurutma yönteminde kullanılan basınçlı havanın akış hızının artması elde edilen mikrokürelerin partikül büyüklüğünü düşürmektedir (101). Peristaltik pompanın hızının artırılması birim zamanda püskürtülecek çözelti miktarını da artırmakta sonuçta partikül büyüklüğü artmakta ayrıca elde edilen küreler tam olarak kuruyamamaktadır (112). Kullanılan polimer konsantrasyonunda artış olması da partikül büyüklüğünü artırmaktadır (114). Ayrıca, sisteme uygulanan vakumdaki artış çok küçük partikül büyüklüğüne sahip mikrokürelerin çözücü buharı ile birlikte çekilerek verimin düşmesine neden olmaktadır (115). Ayrıca kullanılan iğnenin uç açıklığı azaltılırsa püsküren çözelti damlacıkları da küçülmekte sonuçta daha küçük mikroküreler elde edilmektedir.

Püskürterek kurutma yöntemi diğer kitosan mikroküre hazırlama yöntemleri ile kıyaslandığında sadece çözelti değil aynı zamanda emülsiyon ve süspansiyonların da püskürtülmesine olanak vermesi, organik çözücü kullanılmasına gerek bırakmayışı, tamamen sulu bir ortamda üretim yapılması, üretilen kürelerin boyutlarının 10 μm 'den küçük oluşu, istendiğinde çapraz bağlayıcı kullanımına izin vermesi, hızlı ve tekrarlanabilir bir üretim yöntemi olması gibi sebeplerle üstünlük göstermektedir (110,115,116). Ayrıca püskürterek kurutma yönteminde hem hidrofilik hem de hidrofobik yapıda etkin maddelerle çalışılabilmektedir (113). Tablo 2.4'de literatürde yer alan püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikrokürelerine ilişkin çalışmalara örnekler verilmiştir.

Tablo 2.4. Literatürde yer alan püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak hazırlanan kitosan mikrokürelerine ilişkin çalışmalar

Kitosan Tipi (M.A/Viskozite)	Etkin Madde	Uygulama Yolu	Literatür
Kitosan Hidroklorür (Seacure C1 210) Düşük-Orta M.A	Metoklopramid	Oral	116
Kitosan Glutamat (Seacure G110-210) ve Baz (Seacure 123-223-320) Düşük, Orta ve Yüksek M.A	Sodyum Diklofenak	Kolon	105
Kitosan Orta M.A	Vitamin C	Oral	109
Kitosan 200-800 cps viskozite	Klorhekzidin	Buccal	115
Kitosan (M.A 750.000 Da) ve 5-metilpirolidon kitosan (M.A 400.000Da)	Ampisilin	Buccal	113
Kitosan 100 mPaS viskozite	Betametazon	Pulmoner	112
Kitosan 70 mPaS viskozite	Teofilin	Pulmoner	117
Kitosan hidroklorür Protasan UP CL 113 (M.A 160.000) ve Kitosan glutamat	Karbamazepin	Nasal	118
Kitosan Orta M.A (190-310 kDa)	Vankomisin	İntra muskuler	119
Kitosan Orta M.A (400.000 Da)	Loratidin	Nasal	120

2.8. İstatistiksel Yöntemler

Tez çalışmamızda optimizasyon ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi amacıyla kullanılan faktöriyel tasarım ile ilgili bilgiler aşağıda verilmektedir.

2.8.1. Faktöriyel Tasarım Tanımı

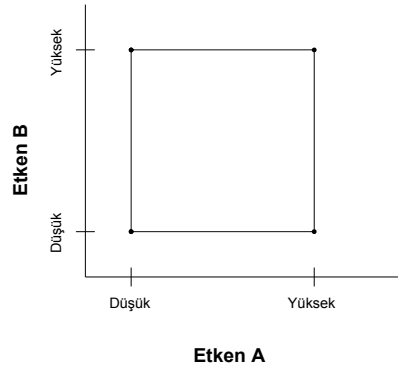
İki ya da daha fazla etkenin bütün olası seviyelerinin etkilerinin aynı anda incelendiği denemelerdir (121).

2.8.2. Kullanım Amacı

Faktöriyel tasarım kullanılarak birden çok etkenin farklı seviyeleri aynı anda incelenmektedir ve bu açıdan bir seferde sadece tek bir etkenin denendiği tasarımlara göre daha etkilidirler. Bir etkenin seviyeleri diğer etkenlerin değişik seviyelerinde ele alınabilmektedir ve bu sayede etkenler arasında bir etkileşmenin olup olmadığı ortaya çıkarılabilmektedir. Olası bir etkileşmenin yönü ve önemi faktöriyel tasarım ile değerlendirilebilmektedir. Bunlara ek olarak faktöriyel tasarım kullanılarak, bir etkenin etkisinin diğer etkenlerin farklı seviyelerinde tahmin edilebilmesi olanaklıdır ve bu da deney koşullarının hangi sınırlar içinde valide edilebileceğini gösterir (121).

2.8.3. 2^2 Faktöriyel Tasarım

2^2 faktöriyel tasarımında iki etkenin iki farklı seviyesi bulunmaktadır. Bu etkenler ve seviyelerinin oluşturduğu kombinasyon noktaları Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. 2^2 faktöriyel tasarım kombinasyon noktaları

Bu tasarımda araştırılan iki etkenin iki farklı seviyesi ve bu seviyelerde yapılacak denemelerin açılımı Tablo 2.5'de verilmiştir. Bu noktalarda yapılan denemeler sonucunda her etkenin her seviyesinde çalışılmış olur (121).

Tablo 2.5. 2^2 faktöriyel tasarımda yapılan denemeler

Deneme Kombinasyonu	Etken		
	A	B	AB
(1)	-	-	+
a	+	-	-
b	-	+	-
ab	+	+	+

Bu tasarımı tanımlayan regresyon denklemi ise aşağıda verilmiştir:

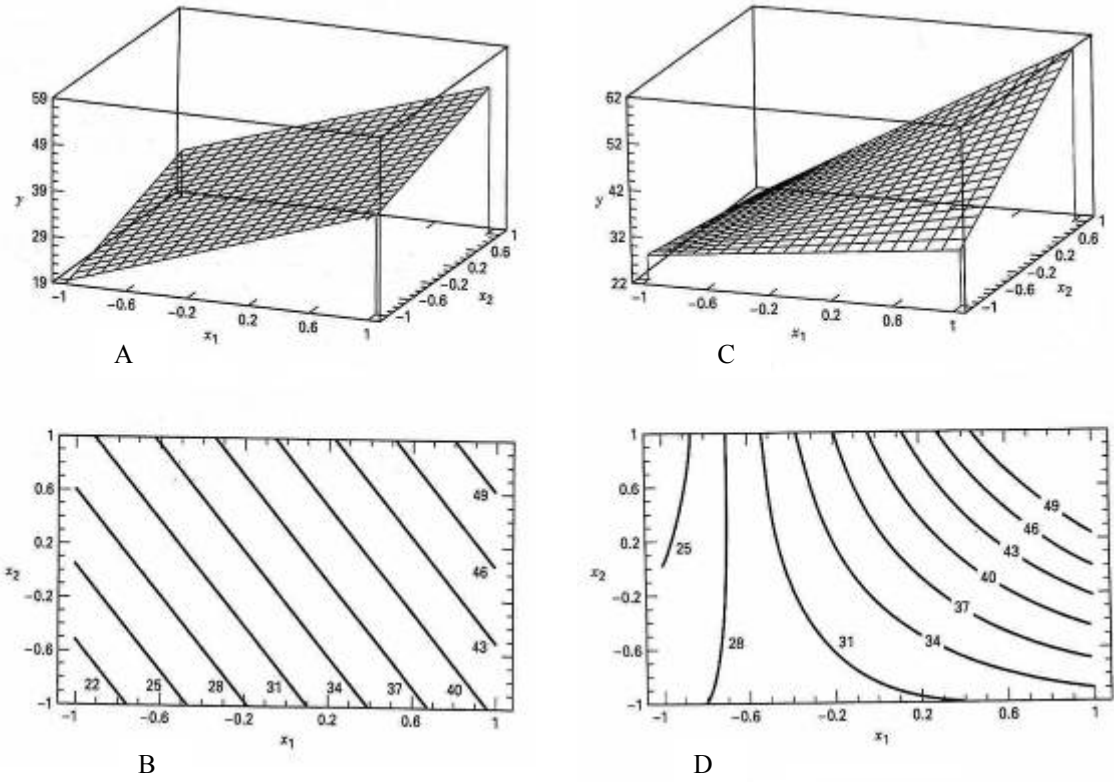
$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad (\text{Eşitlik 2.1})$$

Verilen denklemde y bağımlı değişkeni, x_1 ve x_2 etkenleri, β parametreleri, ε ise hata terimini ifade etmektedir (121).

2.8.4. Faktöriyel Tasarımda Kullanılan Grafikler

Faktöriyel tasarımda sonuçların değerlendirilmesinde ayrıca grafiksel yöntemlerden de faydalanılabilir. Faktöriyel tasarımda kullanılabilecek grafiklerden iki tanesi cevap yüzey grafiği ve izdüşüm haritasıdır (Şekil 2.7)(122).

Şekil 2.7’de görüldüğü gibi araştırılan etkenler arasında herhangi bir etkileşimin olmadığı durumda cevap yüzey grafiği düzlemseldir (Şekil 2.7A) ve izdüşüm haritasıda bulunan çizgiler birbirlerine paralel düz çizgilerdir (Şekil 2.7B). Bununla beraber etkenler arasında etkileşmenin olduğu durumlarda, elde edilen cevap yüzey grafiği bükülmekte ve düzlemsellikten uzaklaşmaktadır (Şekil 2.7C). Aynı şekilde izdüşüm haritası bulunan çizgiler de bükülmekte ve paralellikten uzaklaşmaktadır (Şekil 2.7D). Buna bağlı olarak etkenler arasındaki etkileşmenin eğriselliğin bir ifadesi olduğu da söylenebilir (121).



Şekil 2.7. Cevap yüzey grafikleri ve izdüşüm haritaları.

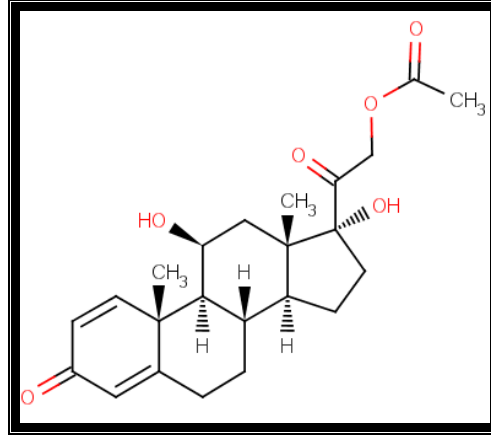
Etkileşimin olmadığı durumda A: cevap yüzey grafiği, B: izdüşüm haritası,

Etkileşimin olduğu durumda C: cevap yüzey grafiği, D: izdüşüm haritası.

2.9. Prednizolon asetat

2.9.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Prednizolon asetat antiinflamatuvar etkili, 21 karbonlu pregnan halkası içeren steroid yapılı sentetik bir kortikosteroid ilaçtır (123,124). Kimyasal yapısı Şekil 2.8’de görülmektedir. Prednizolon asetatın moleküler formülü $C_{23}H_{30}O_6$ ’dır ve beyaz, kristalize bir tozdur (125). Molekül ağırlığı 402,5’dir (125,126).



Şekil 2.8. Prednizolon asetatın kimyasal yapısı

Suda, pratik olarak çözünmez (126,127). Aseton ve kloroformda az çözünür. Erime derecesi 235°C'dir (126,127) ve erime derecesi ile kimyasal olarak bozunmaya başladığı sıcaklık aynıdır. 242 ± % 2,5 nm'de maksimum UV aborbansı verir (128).

2.9.2. Miktar Tayini Yöntemleri

Prednizolon asetat için farklı miktar tayini yöntemleri kullanılmıştır. Bunlar arasında; USP'de de kayıtlı olan HPLC metodu (124,128,129), miseller elektrokinetik kapiller kromatografisi (130), gaz kromatografisi (124,129,131), *radioimmuno assay* yöntemi (132,133), kütle spektroskopisi (124,129,132), ince tabaka kromatografisi (134) ve UV spektroskopisi bulunmaktadır (129).

2.9.3. Farmakolojik Özellikleri

Adrenal korteks tarafından salgılanan steroid yapılı bileşiklerin arasında glukokortikoid yapıda olan hidrokortizon (kortizol) da yer almaktadır. Prednizolon asetat hidrokortizonun sentetik bir türevidir ve vücut içine alındığında hidroliz ile prednizolona çevrilerek aktivite gösterir (123). Sentetik steroidler doğal türevlerine göre (Kortizon) daha güçlü antiinflamatuvar etkiyi daha hızlı göstermektedirler (135).

Prednizolon asetat temel olarak antiinflamatuvar etki elde edilmesi için lokal olarak katarakt ameliyatlarından sonra (136), sistemik olarak akut miyokard infarktüsünden sonra (137) sistemik kortikosteroid eksikliği tedavisinde (125) ve diğer antiinflamatuvar etki istenen durumlarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Yaralanma, infeksiyon ve hastalıklar gibi durumda artan sitokin salgılanması immün sistemi tetikleyerek hücresel olarak makrofajların, T hücrelerinin ve B lenfositlerinin birikmesine yol açar. Hücresel olarak oluşan bu cevap durumunda prednizolon asetat, immün sistemi inhibe ederek sitokinlerin salımını dolayısı ile hücresel olarak inflamasyonu azaltır. Bu da inflamasyonlu bölgede hücre büyümesini ve proliferasyonunu engeller (123). Prednizolon asetat ve içinde bulunduğu farmakolojik grup olan adrenal steroidler inflamasyonu erken ve geç evrelerinde inhibe eder (138).

2.9.4. Stabilitesi

Prednizolon asetat güçlü okside edici bileşikler ile geçimsizdir (139). Oda sıcaklığında plasmada üç saat boyunca stabil olarak bulunmuştur (140). Prednizolon asetat 15 ve 25 kGy dozda γ radyasyonuna maruz bırakıldığında içerik kaybına uğramıştır (141).

2.9.5. Piyasa Preparatları

Prednizolon asetatın USP'ye (128) kayıtlı oftalmik süspansiyonu, steril süspansiyonu ve oftalmik merhem preparatları bulunmaktadır. Prednizolon asetatın Türkiye'deki preparatları arasında; deri hastalıklarında kortikosteroid tedavisinde kullanılan Hexacorton® Krem, allerjik reaksiyonlarda ve inflamasyonda kullanılan Pred-Forte® Oftalmik Süspansiyon ve Suprenil® oftalmik süspansiyon yer almaktadır. Lokal olarak kullanılan bu preparatların endikasyonları çoğunlukla inflamasyondur (142). Dünya pazarında ise Belephamide® adı altında lokal olarak inflamasyonlarda kullanılan oftalmik süspansiyon preparatı yer almaktadır (143).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araçlar ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Diklorometan	Merck, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Etanol	Tekel, Türkiye
Kitosan (Düşük Molekül Ağırlıklı) (M.A:150.000)	Fluka, Almanya
Kitosan (Orta Molekül Ağırlıklı) (M.A:400.000)	Fluka, Almanya
Laktik asit	Fischer, ABD
Polietilen glikol (PEG) 4000 (M.A:3300–4000)	BDH Chemicals, İngiltere
PLGA (50:50) (M.A:34.000 Da)	Medisorb, Merck Dupont, ABD
PLGA (75:25) (M.A:136.000 Da)	Medisorb, Merck Dupont, ABD
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Prednizolon asetat	Abdi İbrahim, Türkiye
Sodyum azid (%99,9)	Sigma, Almanya
Sodyum klorür	Riedel De Haen, Almanya
Sodyum lauril sülfat	Merck, Almanya

3.1.2. Kullanılan Aletler

Diferansiyel taramalı kalorimetre	Q 100, TA Instruments, ABD
Hassas terazi	Shimadzu AX 200, Japonya
FT-IR spektrometresi	Pelkin Elmer 1720X FT-IR
	Spektrofotometresi, ABD
Kapiller erime derecesi tayin cihazı	A. Thomas Company, ABD
Koni-Plak viskozimetresi	Brookfield DV-II+, ABD
Kurutma Tabancası	Labor Gerate Glasapparatebau, Rettberg, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Optik mikroskop	Leica DFC 320, Almanya
Partikül büyüklüğü tayin cihazı	HELOS Sympatec, Almanya
pH metre	Sartorius PP-20, Almanya
Püskürterek kurutucu	BÜCHI 190 Mini Spray-Dryer, İsviçre
Santrifüj aleti	Hermle Z323, Almanya
Taramalı elektron mikroskobu	Jeol – SEM 6400, Japonya
Termostatlı yatay çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Stentler	NEMED, Türkiye
Ultrasonik banyo	Branson B 220 Smith Kline, ABD
Ultraturaks	IKA, Almanya
UV spektrofotometre	Agilent 8453, ABD

3.2. Yöntemler ve Deneyler

3.2.1. Prednizolon Asetatın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

3.2.1.1. UV Spektrumu

Kitosan mikroküre formülasyonları ile stentlere hapsedilen etkin maddenin miktar tayini, in vitro salım çalışmaları ve stabilite deneylerinin sonuçlarının değerlendirilmesinde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla, etkin madde prednizolon asetatin, % 0,5 (a/h) oranında sodyum lauril sülfat ve mikroorganizma üremesinin engellenmesi için % 0,05 (a/h) oranında sodyum azid içeren PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4) çözeltisinde $\lambda = 200-400$ nm aralığında UV spektrumu çekilmiş ve maksimum dalga boyu ($\lambda_{\max}$) belirlenmiştir (126,128,144)

3.2.1.2. FT-IR Spektrumu

Prednizolon asetatin FT-IR spektrumunun çekilmesi için etkin madde, potasyum bromür ile karıştırılmış ve bu karışım 10 t/cm^3 basınçla pelletler halinde basılmıştır. Oluşturulan bu pellet örneklerinin FT-IR spektrumları, $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında çekilerek etkin madde prednizolon asetatin FT-IR spektrumu elde edilmiştir.

3.2.1.3. Erime Derecesi Tayini

Erime derecesi tayini için prednizolon asetat kılcal tüp içerisine konulmuş ve kapiller erime derecesi tayin cihazı ile analiz gerçekleştirilmiştir. Cihaza tüpler yerleştirildikten sonra beklenen erime derecesinin 10°C altına kadar hızlı ısıtma yapılmış, bu seviyeden sonra sıcaklık daha yavaş yükseltilerek etkin maddenin erimeye ya da bozunmaya başladığı sıcaklık ile erime ya da bozunmanın tamamlandığı sıcaklık aralığı kaydedilmiştir.

3.2.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Bilindiği üzere, diferansiyel taramalı kalorimetri yöntemi kimyasal maddelerin termodinamikleri, stabiliteleri ile moleküler yapılarının tayini ve incelenmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır (145). Tez çalışmamız kapsamında da prednizolon asetatın termal özelliklerinin incelenmesi için DSC termogramı çekilerek erime ve bozunma dereceleri tayin edilmiştir. Termogramların çekilebilmesi için standart küçük hacimli alüminyum örnek kaplarına 4 mg prednizolon asetat, kabın bütün yüzeyine temas edecek ve boşluk kalmayacak şekilde doldurulmuştur. Örnek kabının kapağı kapatma aletinin yardımıyla sıkıca ve tam olarak kapatılmıştır. Elde edilen preslenmiş plaka aletin analiz bölmesine yerleştirilerek analiz başlatılmıştır. DSC çalışmalarında kullanılan analiz şartları aşağıda verilmiştir;

- ▲ Atmosfer: Azot (50 mL/dakika)
- ▲ Başlangıç ve bitiş sıcaklıkları: 25-350 °C
- ▲ Sıcaklık yükseltme ve soğutma hızı: 10 °C/dakika
- ▲ Standart: İndium

3.2.2. Prednizolon Asetatın Spektrofotometrik Miktar Tayini

3.2.2.1. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması

Prednizolon asetatın % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisindeki kalibrasyon doğruları, bu çözücüde 50 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmış olan altı ana stok çözeltisinden hareketle elde edilmiştir. Her bir stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 2,5-20 µg/mL konsantrasyon aralığında sekiz standart çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin absorpsanları 247 nm’de okunarak regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğruları ve denklemleri elde edilmiştir.

3.2.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, tayini yapılacak olan etkin maddenin miktar tayin yönteminin istenilen amaca yönelik olduğunu, uygulama bakımından doğru, kesin bir şekilde ve sürekli olarak kullanılabilirliğini göstermek için uygulanan bir işlemdir. Farmasötik preparattaki etkin maddenin tayininde kullanılacak analitik bir yöntem validasyonunun performans kriterleri şunlardır:

- ▲ Özgünlük (Specificity)
- ▲ Doğrusallık (Linearity)
- ▲ Doğruluk (Accuracy)
- ▲ Kesinlik (Precision)
 - ▲ Tekrar edilebilirlik (Repeatability)
 - ▲ Tekrar elde edilebilirlik (Reproducibility)
- ▲ Stabilité

3.2.2.2.1. Özgünlük

Prednizolon asetat için kullanılan analitik yöntemin (UV Spektroskopisi) maddeye özgün olduğunu kanıtlamak, mikroküre ve stentlerdeki ya da çözücüler içindeki bileşenlerin ölçüm yapılan dalga boylarında prednizolon asetat ile girişim yapan bir absorbans vermediğini göstermek amacıyla, çözündürülen boş mikrokürelerin, stentlerin ve çözücülerin (PBS, etanol, diklorometan) UV spektrumları incelenmiştir.

3.2.2.2.2. Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, deney bulgularının örnek içindeki etkin madde konsantrasyonu ile olan ilişkisinin belli bir aralıkta doğrusal olduğu anlamına gelir. Bu parametrenin incelenmesinde kullanılacak olan kalibrasyon doğruları en az beş konsantrasyonda çalışılarak çizilebilmektedir (128). Bu amaçla altı adet 50 µg/mL konsantrasyondaki stok çözeltilerinden hareketle gerekli seyreltmeler

yapılarak sekiz farklı konsantrasyonda altışar adet çözelti hazırlanmış ve absorbansları ölçülmüştür. Çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrularının denklemleri elde edilmiştir.

3.2.2.2.3. Doğruluk

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem yardımıyla bulunan sonuçlar ile elde edilen deney sonuçlarının arasındaki uygunluk veya yakınlığın derecesidir. Analitik bir yöntemin doğruluğunun tespiti için en az üç farklı konsantrasyonda, her bir konsantrasyon değerinde en az beş seri çözelti hazırlanarak ölçümlerin yapılması gerekmektedir (128). Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu göstermek için dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 µg/mL) altışar adet çözelti hazırlanarak absorbansları ölçülmüştür.

Prednizolon asetatın miktar tayini için kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun araştırılması için Formül 3.1 kullanılmıştır (146).

$$\text{Doğruluk (\% ortalama bağıl hata)} = (X - Y) / Y \times 100 \quad (\text{Formül 3.1})$$

X= Ölçülen konsantrasyon (µg/mL)

Y= Hazırlanan konsantrasyon (µg/mL)

3.2.2.2.4. Kesinlik

Belirlenen şartlarda yapılan bağımsız test sonuçları arasındaki uyumu ifade eden bir validasyon kriteridir (147). Standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) ile ifade edilen analitik yöntem kesinliği, istatistiksel olarak anlamlı sayıda aynı konsantrasyondaki örneklerin absorbans değerlerinin art arda ölçülmesi ile değerlendirilir. Kesinlik, normal deney koşulları altında bir analitik yöntemin tekrar edilebilirlik (repeatability) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) derecesinin ölçüsüdür.

Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin değerlendirilmesi için 50 µg/mL' lik stok çözeltiden hareketle kalibrasyon doğrusu üzerinde yer alan beş farklı konsantrasyonda (2,5, 5, 10, 15, 20 µg/mL) birer çözelti hazırlanmış ve her bir konsantrasyondaki çözeltinin absorbansı altı defa üst üste ölçülmüştür.

Tekrar elde edilebilirliğin incelenmesinde ise aynı stoktan hareket edilerek seyreltmeyle 5, 10, 15, 20 µg/mL konsantrasyon değerlerinde altışar adet çözelti hazırlanarak bu çözeltilerin absorbanları birer defa ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda bulunan değerlerden kalibrasyon doğrusu yardımıyla konsantrasyonlar hesaplanarak ortalama, SS ve VK bulunmuştur. Analitik yöntemin tekrar elde edilebilir olduğunun kabul edilebilmesi için VK'nın % 2'den küçük olması gerekmektedir.

3.2.2.2.5. Stabilité

Prednizolon asetatın % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisindeki stabilitesini incelemek için bu çözelti içinde 15 µg/mL konsantrasyonda prednizolon asetat çözeltisi hazırlanmış ve 37 °C'de saklanmıştır. 1., 3., 5., 7., 10., 15., 21., 28., 35., 42., 49. ve 60. günlerde çözeltinin spektrumu alınmıştır. Elde edilen spektrumlar ve λ_{max} değerleri karşılaştırılarak prednizolon asetatın bozunmaya başladığı zaman aralığı araştırılmıştır.

3.2.3. Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Bu bölümde, kullanılan polimerlere (PLGA ve kitosan) ilişkin fizikokimyasal özellikleri incelemek amacıyla yapılan viskozite tayini çalışmaları ve DSC ile yapılan analiz yöntemleri ile ilgili bilgi verilecektir.

3.2.3.1. Viskozite Çalışmaları

Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan polimeri tiplerinin % 1'lik (h/h) laktik asit içerisindeki değişik konsantrasyonlardaki çözeltilerinin viskozitelerinin püskürterek kurutma işlemi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla, Brookfield DV-II+ Koni-Plak viskozimetresi ile ölçümler yapılmıştır. Her örnekten 0,5 mL alınarak değişik dönme hızlarında (rpm) analiz gerçekleştirilmiştir. Kayma hızına karşı elde edilen kayma gerilimi değerleri grafiğe geçirilmiş ve örneklerin gösterdikleri reolojik akış tipi belirlenmiştir. Ayrıca her bir polimer çözeltisi örneği için 25 ± 2 °C'de ve $76,8 \text{ sn}^{-1}$ kayma hızında viskozite değerleri kaydedilerek istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Kullanılan PLGA polimerleri için ise üretici firmanın sertifikalarında belirttiği intrinsik viskozite değerleri dikkate alınmıştır. Buna göre PLGA (75:25) polimeri yüksek intrinsik viskoziteye, PLGA (50:50) polimeri ise düşük intrinsik viskoziteye sahiptir.

3.2.3.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Termogramlarının İncelenmesi

Tez çalışmamızda kullanılan polimerlerin termal davranış özelliklerinin incelenmesi amacıyla farklı molekül ağırlıklarına (orta ve düşük) sahip kitosan tipleri ile PLGA'nın farklı kopolimer oranlarına sahip (50:50 ve 75:25) tiplerinin DSC termogramları çekilmiştir. Söz konusu polimerlerden kitosan için alüminyum örnek kapları kullanılmıştır. Örnek kabının yüzeyini tamamen kaplayacak kadar polimer örneği hassasiyetle tartılmış ve kaplar kapatıldıktan sonra analiz gerçekleştirilmiştir. PLGA kopolimerlerinin DSC analizlerini gerçekleştirmek için ise alüminyum hermetik örnek kapları kullanılmıştır. Gerekli miktarlarda tartılan polimer örnekleri kaplar içine yerleştirilmiş ve kapatılan örnek kapları cihaza yerleştirilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Bütün analizlerde standart olarak indium kullanılmıştır. Polimerlerin DSC analizlerinde kullanılan şartlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan polimerlerin DSC analiz şartları

Polimer	Atmosfer*	Başlangıç Sıcaklığı	Bitiş Sıcaklığı	Sıcaklık Yükseltme/ Soğutma Hızı
Kitosan (orta ve düşük M.A.)	Azot	25 °C	350 °C	10 °C/dakika
PLGA (kopolimer oranı 50:50 ve 75:25)	Azot	20 °C	250 °C	10 °C/dakika

*Azot akış hızı : 50 mL/dakika

3.2.4. Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması

3.2.4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Mikroküre formülasyon çalışmalarında doğal bir biyopolimer olan kitosanın iki farklı molekül ağırlığına sahip tipi (düşük M.A: 150.000 Da, ve orta M.A: 400.000 Da) kullanılmıştır. Mikroküre üretim yöntemi olarak püskürterek kurutma tekniği; istenen boyutlarda (1-10 µm) mikroküre üretilmesini sağladığı ve organik çözücü kullanımını gerektirmediği için tercih edilmiştir. Literatürde püskürterek kurutma tekniğine ilişkin formülasyon çalışmalarında yer alan (101,115,148,149) teknik şartların ve deney koşullarının (hava basıncı, akış hızı, aspirasyon, sıcaklık ve pompa hızı) standardizasyonu ve hazırlanan mikroküre formülasyonlarının üretim verimi dikkate alınarak optimum koşullar tespit edilmeye çalışılmıştır. Oluşan yapıların küresel olup olmadıkları araştırılmış sonrasında ise üretim veriminin artırılması hedeflenmiştir. Yapıların küreselliklerinin kontrolünde bilgisayar sistemine bağlı Leica DFC 320 optik mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) fotoğrafları kullanılmıştır. Üretim veriminin artırılması için yapılan çalışmalarda ise farklı konsantrasyonlarda kitosan çözeltileri kullanılmış ve elde edilen mikrokürelerin üretim verimleri değerlendirilmiştir. Prednizolon asetatın çözüldürülerek polimer çözeltisine karıştırılacağı çözücüler ile kitosan arasında bir geçimsizlik olup olmadığının anlaşılması için kitosan çözeltileri alkol, diklorometan ve aseton ile karıştırılmış ve olası bir fiziksel geçimsizlik kontrol edilmiştir.

3.2.4.2. Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanmasında Kullanılan Faktöriyel Tasarım

Püskürterek kurutma yöntemi ile kitosan mikrokürelerinin hazırlanmasında 2^2 faktöriyel tasarım kullanılmıştır. Bu amaçla kitosan polimerinin iki farklı molekül ağırlığına sahip olan tipi (M.A: 150.000 Da ve M.A: 400.000 Da) seçilmiştir. Kullanılan 2^2 faktöriyel tasarımda bağımsız değişken olarak; polimer konsantrasyonu (%) ve hedeflenen yükleme oranı (%) iki farklı etken olarak alınmıştır. Tez çalışmamızda polimer konsantrasyonu etkeninin seviyeleri düşük (% 0,5) ve yüksek (% 1), hedeflenen yükleme oranı etkeninin seviyeleri de düşük (% 10) ve yüksek (% 20) olarak belirlenmiştir. Kurulan deney düzeninde her etkenin her seviyesinde çalışılmış ve formülasyonlar geliştirilmiştir. Tablo 3.2’de iki farklı kitosan polimeri kullanılarak geliştirilen (orta ve düşük molekül ağırlıklı) formülasyonlardaki etkenler ve deney düzeni gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan 2^2 faktöriyel tasarımda etkenler ve düzeyleri

Etkenler	Düzeyleri	
Hedeflenen Yükleme Oranı	% 10	% 20
Polimer Konsantrasyonu	% 0,5	% 1

Hazırlanan mikroküre formülasyonlarındaki etkenlerin bağımlı değişkenler üzerine etkileri incelenmiştir. Bağımlı değişkenler:

- ▲ Ortalama partikül büyüklüğü (μm)
- ▲ Yüklenen prednizolon asetat miktarı (%)
- ▲ İn vitro salımda $t_{\%50}$ değerleri (saat) olarak belirlenmiştir.

Faktöriyel tasarım kullanılarak bağımlı değişkenler üzerinde bağımsız değişkenler olan polimer konsantrasyonu ve hedeflenen yükleme oranının etkilerinin önemi ve etkenler arasındaki olası bir etkileşme incelenmiştir. Ayrıca polimer

konsantrasyonu ve hedeflenen yükleme oranı etkenlerinin bağımlı değişkenler üzerindeki etkilerini ifade eden regresyon doğruları bulunarak bu doğruların yüzey-cevap ve izdüşüm grafikleri çizilmiştir. Tablo 3.3’de 2^2 faktöriyel tasarım kullanılarak oluşturulan mikroküre formülasyonlarının bileşenleri ve kodları yer almaktadır.

Tablo 3.3. 2^2 faktöriyel tasarım uygulanarak hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonlarının kodları ve bileşenleri

Formülasyon Kodu	Polimer Tipi	Polimer Konsantrasyonu (%)	Hedeflenen Yükleme Oranı (%)
CL0,5	Düşük M.A.	0,5	- (Boş mikroküre)
CL1	Düşük M.A.	1	- (Boş mikroküre)
CM0,5	Orta M.A.	0,5	- (Boş mikroküre)
CM1	Orta M.A.	1	- (Boş mikroküre)
CL0,5PA10	Düşük M.A.	0,5	10
CL0,5PA20	Düşük M.A.	0,5	20
CL1PA10	Düşük M.A.	1	10
CL1PA20	Düşük M.A.	1	20
CM0,5PA10	Orta M.A.	0,5	10
CM0,5PA20	Orta M.A.	0,5	20
CM1PA10	Orta M.A.	1	10
CM1PA20	Orta M.A.	1	20

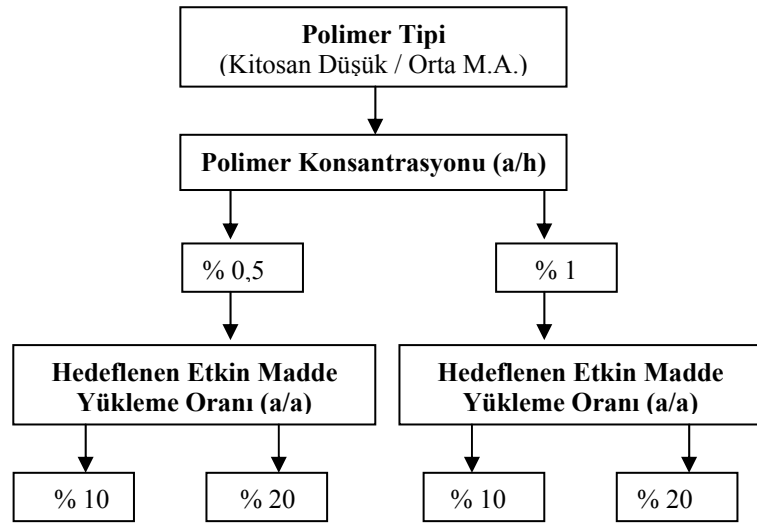
3.2.4.3. Püskürterek Kurutma Yöntemi ile Mikrokürelerin Hazırlanması

Kitosan mikroküreleri hazırlanmasında püskürterek kurutma yöntemi kullanılmıştır (101,110,111,115,150,151). Bölüm 3.2.4.2’de verilen bilgiler doğrultusunda farklı polimer tipi, konsantrasyonu ve hedeflenen yükleme oranına sahip olan sekiz mikroküre formülasyonu üretilmiştir. Bu amaçla, kitosan polimerinin (düşük ya da orta molekül ağırlıklı), % 1 (h/h) laktik asit içerisinde % 0,5 (a/h) ve % 1 (a/h) konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Polimerin tam

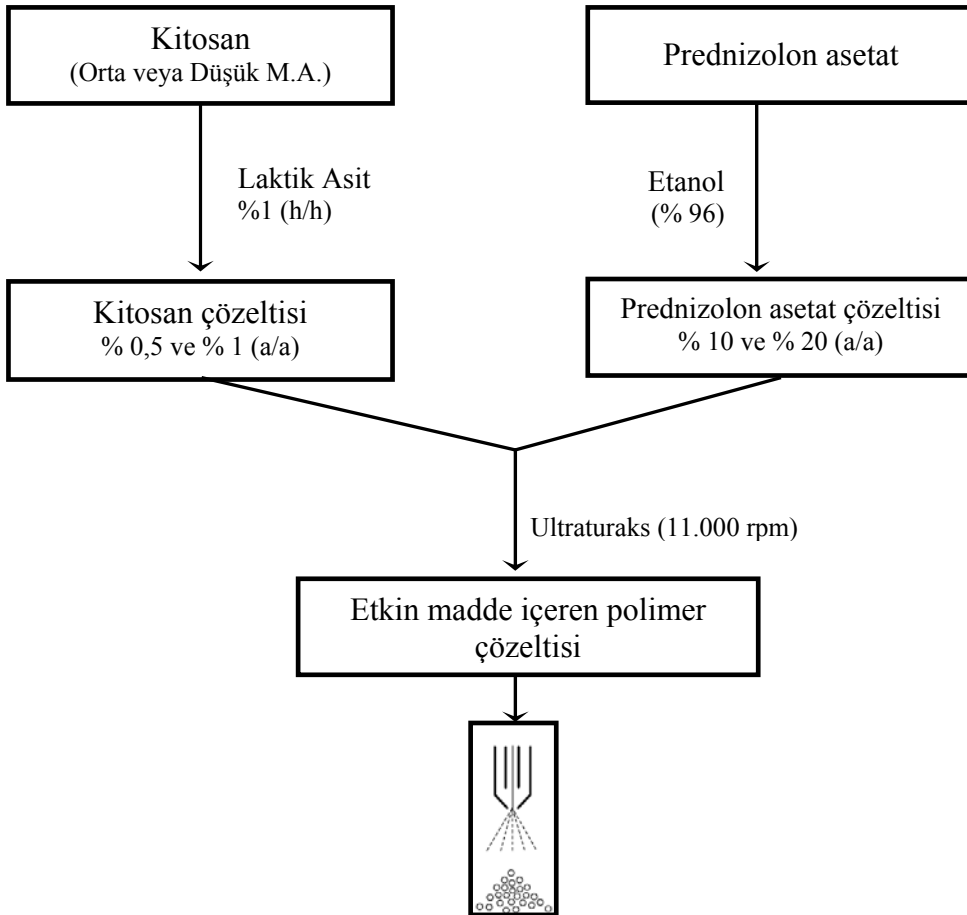
olarak çözünmesi için 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırma sağlanmıştır. Etkin madde içermeyen mikrokürelerin eldesi için hazırlanan polimer çözeltileri püskürtülerek boş mikroküreler üretilmiştir. Etkin madde (Prednizolon asetat) içeren mikrokürelerin üretilmesi için kullanılan polimerin ağırlıkça % 10'u ve % 20'si oranında prednizolon asetat, gerekli miktar alkolde ultrasonik banyoda tutularak çözündürülmüştür. Hazırlanan polimer çözeltileri üzerine prednizolon asetatın alkoldeki çözeltisi damla damla 10 mL/dakika hızında eklenmiştir (150). Tam ve homojen bir karışmanın sağlanması için ekleme yapılırken karışım ultraturaks kullanılarak 11.000 rpm'de karıştırılmıştır. Prednizolon asetatın alkoldeki çözeltisi eklendikten sonra karışım 1 dakika daha ultraturaksta tutulmuş ve hazırlanan çözeltiler püskürtülerek etkin madde içeren mikroküreler hazırlanmıştır. Üretilen mikroküreler cam flakonlarda, ışıktan korunarak, oda sıcaklığında desikatör içinde saklanmışlardır. Ön formülasyon çalışmaları sırasında standardize edilen püskürterek kurutma işlemine ilişkin deney koşulları aşağıda verildiği gibidir:

▲ Basınç	: 7 bar
▲ Akış Hızı	: 600 Nl/saat
▲ Aspiratör Seviyesi	: 10
▲ Giriş Sıcaklığı	: 130 °C
▲ Çıkış Sıcaklığı	: 70 °C
▲ Pompa Hızı	: 5 mL/dakika
▲ İğne Ucu Açıklığı	: 0,5 mm

Kitosan mikroküre formülasyonlarının içerikleri ve hazırlama yönteminin şematik gösterimi Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3.1. 2² faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının içeriklerinin şematik gösterimi



Şekil 3.2. 2² faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının üretim şeması

3.2.5. Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerin karakterizasyonu amacı ile morfolojik özellikleri, partikül büyüklüğü tayini yapılmış, üretim verimi ve mikrokürelere yüklenen prednizolon asetat miktarı hesaplanmıştır. Ayrıca mikrokürelerin DSC ile termodinamik özellikleri de araştırılmıştır. Üretilen mikrokürelerden prednizolon asetatın salımının incelenmesi ve salım özelliklerinin değerlendirilebilmesi için in vitro salım çalışmaları yapılmıştır.

3.2.5.1. Morfolojik Özellikler

Etkin madde yüklü olan ve olmayan mikrokürelerin yüzey özellikleri SEM kullanılarak incelenmiştir¹. Mikroküre örnekleri pirinç levhalar üzerine çift tarafı yapışkan bantla sabitlenerek kaplama cihazında (Hummle VII Sputter Coating Device, Anatech) yaklaşık 130°A kalınlığında altın ile kaplanmıştır. Uygulanan kaplama işlemi sonrasında örnekler SEM cihazına (JEOL JSM-6400) yerleştirilmiştir. Örneklerin incelenmesi sırasında 20 kV'luk voltaj uygulanmış ve farklı büyütme oranlarında mikrokürelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5.2. Partikül Büyüklüğü Tayini

Hazırlanan mikrokürelerin partikül büyüklükleri HELOS partikül büyüklüğü ölçüm cihazı (SympaTec, Almanya) kullanılarak tayin edilmiştir². Kitosan mikroküreleri sulu ortamlarda şişme eğilimi gösterdiğinden ortam olarak izopropil alkol kullanılmıştır (101). Örnekler analiz öncesinde 1 dakika izopropanol içinde ultrasonik banyoda tutularak süspande edilmiş ve partikül büyüklüğü ölçümleri yapılmıştır (115).

3.2.5.3. Mikrokürelerin Üretim Verimi

Mikrokürelerin üretiminde kullanılan püskürterek kurutma yönteminin etkinliğinin değerlendirilmesi amacı ile hazırlanan formülasyonların üretim verimi

hesaplanmıştır. Bu amaçla her bir serinin üretiminden sonra elde edilen mikroküre ağırlığı (g olarak), kullanılan polimer ağırlığı ve etkin madde ağırlığının toplamına oranlanmış ve bulunan değer yüzde cinsinden ifade edilmiştir (150). Her seri için elde edilen bu değerlerin ortalaması ve standart sapması bulunarak, her bir formülasyon için üretim verimi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Verim} = (A / B) \times 100 \quad (\text{Formül 3.2})$$

A: Elde edilen mikroküre ağırlığı

B: Polimer + etkin madde ağırlığı

3.2.5.4. Mikrokürelere Yüklenen Prednizolon Asetat Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Mikrokürelere yüklenen etkin madde miktarının belirlenmesi için 10 mg mikroküre hassas terazide tam olarak tartılmış ve balon jojeye aktararak üzerine 10 mL etanol eklenmiştir. Karışım, prednizolon asetatin mikrokürelere ekstre edilebilmesi için 1 saat süresince ultrasonik banyoda tutulmuştur. Elde edilen dispersiyon, filtre kağıdından süzölmüş ve elde edilen süzöntünün absorpsiyonu 247 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçülen absorpsiyon değeri kalibrasyon doğrusu denklemine yerleştirilerek bu absorpsiyon değerine karşılık gelen konsantrasyon saptanmış ve etkin maddenin yükleme etkinliği hesaplanmıştır.

3.2.5.5. Mikrokürelerin Termodinamik Özelliklerinin Araştırılması

Hazırlanan mikrokürelerin termodinamik özelliklerinin araştırılması için DSC analizleri yapılmıştır. Bu amaçla üretilen mikrokürelere en uzun süre salım özelliği gösteren iki formülasyon, DSC analizleri için seçilmiştir. Analiz için standart alüminyum örnek kaplarını tam olarak dolduracak kadar numune örnek kabının

¹ Analiz ODTÜ Malzeme Mühendisliği Fakültesi’nde yapılmıştır.

² Analiz Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’nda yapılmıştır.

yüzeyini tam olarak kaplayacak ve boşluk bırakmayacak şekilde doldurulmuştur. Analizde etkin madde içermeyen mikroküre, etkin madde içeren mikroküre formülasyonları, prednizolon asetat ve orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerlerinin 25-350 °C arasında DSC termogramları çekilerek, mikroküre formülasyonu içine hapsedilen prednizolon asetatın özelliklerindeki değişimler incelenmiştir. Analizlerde, Bölüm 3.2.1.4’de verilen deney koşulları kullanılmıştır.

3.2.5.6. İn Vitro Salım Deneyleri

3.2.5.6.1. Salım Ortamı ve Deneyin Yapılışı

Salım deneylerinde hazırlanan mikrokürelere prednizolon asetatın salım özelliklerinin incelenmesi için kullanılan ortam % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) tamponudur. Salım ortamında bulunan sodyum azid, mikrobiyolojik üremeyi engellemek amacıyla kullanılmıştır. Salım deneyleri için hassas terazide tartılmış olan 5 mg’lık mikroküre formülasyonları 1,5 mL’lik Eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerine 1,25 mL salım ortamı ilave edilmiştir. Her formülasyon için bu şekilde hazırlanan 6 salım hücresi, sıcaklığı $37 \pm 0,5$ °C’de sabit tutulan yatay çalkalayıcılı su banyosuna yerleştirilmiştir. Aynı zamanda prednizolon asetat içermeyen ve deneylerde kör olarak kullanılacak mikrokürelere de aynı işlemler uygulanmıştır. İn vitro salım deneylerinde bir Eppendorf tüpü içerisine stabilite değerlendirmesi için etkin madde konmuş ve in vitro salım şartlarında tutulmuştur. Yatay çalkalayıcının hızı 50 devir/dakika’ya ayarlanmıştır. Salım deneyleri sırasında önceden belirlenen zaman noktalarında (15. dak, 30. dak, 1., 2., 4., 6., 8., 12., 24., 36., 48., 56., 72., 96., 120., 144., 168., 192., 216., 240. ve 264. saatler) Eppendorf tüpleri alınarak 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve ortamdaki kitosan mikrokürelere çöktürülmüştür. Süpernatant alınmış ve yerine aynı miktar taze salım ortamı eklenmiştir. Alınan örneklerin 247 nm’deki absorbanları UV spektrofotometresinde okunmuş ve elde edilen değerler kalibrasyon doğrusuna yerleştirilerek zamana bağlı olarak salınan yüzde kümülatif prednizolon asetat miktarı bulunmuş ve salım grafikleri çizilmiştir. Etkin madde

salımının 0.derece, Higuchi ve Hixon-Crowell modellerine göre kinetik değerlendirmeleri yapılmıştır.

3.2.5.6.2. İn Vitro Salım Deneylerinin Validasyonu

İçerdiği etkin madde miktarı Bölüm 3.2.5.4’de verildiği şekilde tayin edilen mikroküre formülasyonları için in vitro salım deneylerinin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir mikroküre formülasyonu için Bölüm 3.2.5.6.1’de belirtildiği gibi hazırlanan altışar çözünme hücresinden, her bir örnek alma zamanında analiz yapılarak etkin madde için X, SS ve VK hesaplanmıştır. Böylece her bir formülasyonun in vitro salım çalışmasında bütün örnek noktaları için tekrar elde edilebilirlik ve doğruluk parametreleri bulunmuştur. Özgünlük parametresi salım ortamında miktar tayini validasyonu çalışmalarında verilmiştir. Salım ortamında stabilite değerlendirmesi Bölüm 3.2.2.2.5’de yapılmıştır. Bu validasyon kriterlerinden örnek alma zamanlarında salınan etkin madde için VK değerlerinin ortalaması alınarak in vitro salım deneyinin validasyonu değerlendirilmiştir. VK değerlerinin ortalamasının % 5’den küçük olması istenmektedir (152).

3.2.6. Biyoparçalanır PLGA Stentlerinin Hazırlanması

3.2.6.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Polimerik yapıdaki biyoparçalanır kardiyovasküler stentlerin hazırlanması için sentetik bir polimer olan PLGA’nın kullanılmasına karar verilmiştir. Polimerin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı ve biyoparçalanır oluşu, farklı türleri kullanılarak parçalanma süresinin ve etkin maddenin salım kinetiklerinin kontrol edilebilmesi gibi özellikleri bu seçimde etkili olmuştur. Tez çalışmamızda PLGA 75:25 (% 75 laktik asit-% 25 glikolik asit, M.A: 136.000 Da) ve PLGA 50:50 (% 50 laktik asit-% 50 glikolik asit, M.A: 36.000 Da) polimerleri kullanılmıştır. Polimerdeki laktik asit oranındaki artış hidrofilik özelliği azalttığından parçalanma ve buna bağlı olarak su absorplama ve salım süresi gibi özellikleri uzatmaktadır (153). Bu özellikler nedeniyle % 75’den daha fazla oranda laktik asit içeren PLGA

türevlerinin kullanımından vazgeçilmiştir. Bununla beraber oluşturulacak olan stent yapılarının fiziksel olarak dayanıklı olmaları gerektiğinden % 50'den daha fazla oranda glikolik asit içeren PLGA türleri de kullanılmamıştır. Çünkü glikolik asit oranı arttıkça yapının hidrofilik özelliği artmakta bu durum parçalanma ve su absorplanmasını, ilacın salım süresini kısaltmakta ayrıca yapının fiziksel olarak dayanıklılığı üzerinde de olumsuz etkilere yol açmaktadır (76).

Literatürde biyoparçalanır stentlerin hazırlanması tarif edilen yöntemler içinden (36,65,76,91,154) polimer filmlerinden hareketle biyoparçalanır stentlerin hazırlanması yöntemi uygun yöntem olarak seçilmiştir. Bu hedef doğrultusunda polimer filmlerinin hazırlanması için uygun PLGA yüzdesini bulmak amacıyla farklı konsantrasyonlarda PLGA çözeltileri hazırlanmış ve çözelti-dökme (solution-casting) yöntemiyle elde edilen filmlerin şekil alabilme özellikleri ve fiziksel dayanıklılıkları incelenmiştir. Ayrıca filmlerin esnek yapıda olmalarının sağlanması için farklı plastizerler ve oranları da denenmiş ve uygun konsantrasyonda plastizer seçilmiştir. Polimer filmlerinin hazırlanması sırasında çözücünün uçurulurken film yapısında bir değişiklik olup olmadığı da incelenmiş ve en uygun kurutma yöntemi araştırılmıştır. Polimer filmlerine verilecek optimum stent şekline karar verilebilmesi için literatürde yer alan fiziksel olarak farklı şekiller (31,90) ve yöntemler denenerek tez çalışmamıza ve amacımıza uygun stent yapısına karar verilmiştir. Ayrıca ilaç salan biyoparçalanır kardiyovasküler stent hazırlanması için polimerik yapılara karıştırılacak olan prednizolon asetat ve prednizolon asetat içeren kitosan mikrokürelerinin, stent yapıları üzerinde olumsuz bir etkisi olup olmadığı da görsel olarak incelenmiştir.

3.2.6.2. Stentlerin Hazırlanmasında Kullanılan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) Polimer Filmlerinin Hazırlanması

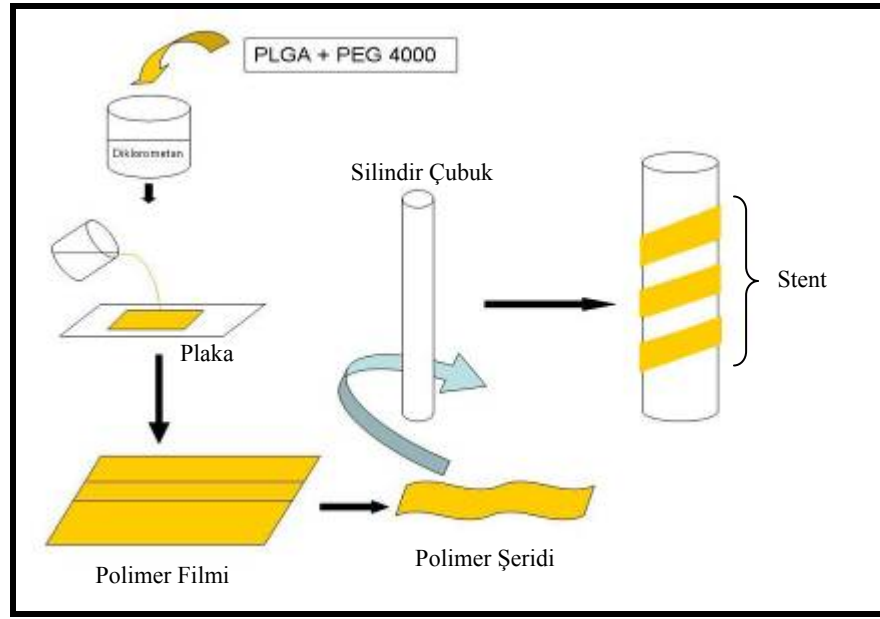
PLGA polimeri ile film hazırlanması için çözelti-dökme (solution-casting) yöntemi kullanılmıştır (90,154-157). Bu yöntemle göre PLGA (75:25) ve (50:50) polimerleri ayrı ayrı % 25 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde diklorometan içinde çözündürülmüşlerdir. Filmlerin kırılkan yapıda olmasını engellemek amacıyla PEG

4000 plastizer olarak % 0,5 (a/h) konsantrasyonunda polimer çözeltisine eklenmiştir (158,159). Polimerlerin tamamen çözünmesi için karışım 2 saat manyetik karıştırıcıda 75 rpm'de karıştırılmıştır. Oluşan çözeltiden etkin madde içermeyen polimer filmlerinin hazırlanması için mikropipet yardımıyla 500 µL alınmış ve alüminyum folyo ile kaplanmış olan 3x7 cm boyutlarına sahip pürüzsüz bir cam plakanın üzerindeki 2x3 cm'lik bir alana yayılmıştır. Bu plakalar diklorometanın kontrollü ve yavaş bir şekilde uzaklaştırılması için buzdolabında (+4 °C) 24 saat bekletilmiştir (160,161). Bu sürenin sonunda plakalar diklorometanın tamamen uzaklaştırılması için bir hafta boyunca etüvde (40 °C) tutulmuşlardır. Polimer filmleri düzenli aralıklar ile tartılarak diklorometanın tamamen uzaklaştığı ve ağırlık değişiminin sonlandığı süre tesbit edilmiştir. Bir haftanın sonunda diklorometanın uzaklaşmasına bağlı olarak sertleşen filmler 0,3x3 cm'lik şeritler halinde kesilerek stentlerin hazırlanması amacıyla kullanılacak olan PLGA polimer filmleri elde edilmiştir.

3.2.6.3. Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması

Biyoparçalanır kardiyovasküler stentlerin üretilmesi için PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerleri kullanılmıştır. Stent yapılarının hazırlanması için Bölüm 3.2.6.2'de anlatılan film hazırlama yöntemi üzerinde bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Bu yöntemle göre PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerleri ayrı ayrı % 25 (a/h) konsantrasyonunda olacak şekilde diklorometan içinde çözülmüştür (157,162). Polimerler çözüldükten sonra karışıma % 0,5 (a/h) oranında PEG 4000 eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır. Oluşan polimer çözeltisi etkin madde içermeyen stentlerin hazırlanması amacı ile alüminyum folyo ile kaplanmış olan pürüzsüz bir plakanın üzerindeki 2x3 cm'lik bir alana mikropipet yardımıyla 500 µL alınarak yayılmıştır (155,158). Bu plakalar diklorometanın kontrollü ve yavaş uzaklaşması için buzdolabına (+4 °C) konmuş ve 1 saat boyunca bekletilmiştir (157,160,161). Bu sürenin sonunda buzdolabından alınan plakalar üzerindeki polimer filmleri 0,3x3 cm'lik şeritler halinde kesilmişlerdir. Bu şekilde her bir plakadan 6 polimer şeridi elde edilmektedir. Bu şeritler 3 mm çapındaki silindirik pirinç çubuklara helezonal şekilde sarılmışlardır

(65,90,154). Üzerinde polimer şeritlerinin sarılı olduğu çubuklar diklorometanın tamamen uçurulması için etüve (40 °C) yerleştirilmişlerdir. Bir hafta boyunca etüvde tutulan çubuklar bu sürenin sonunda alınmışlar ve diklorometanın uzaklaşmasına bağlı olarak sertleşen stent yapıları çubukların üzerinden çıkarılarak ağızları kapalı plastik saklama kapları içerisinde ışıktan korunarak saklanmıştır. Stentlerin hazırlanmasına ilişkin üretim şeması Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



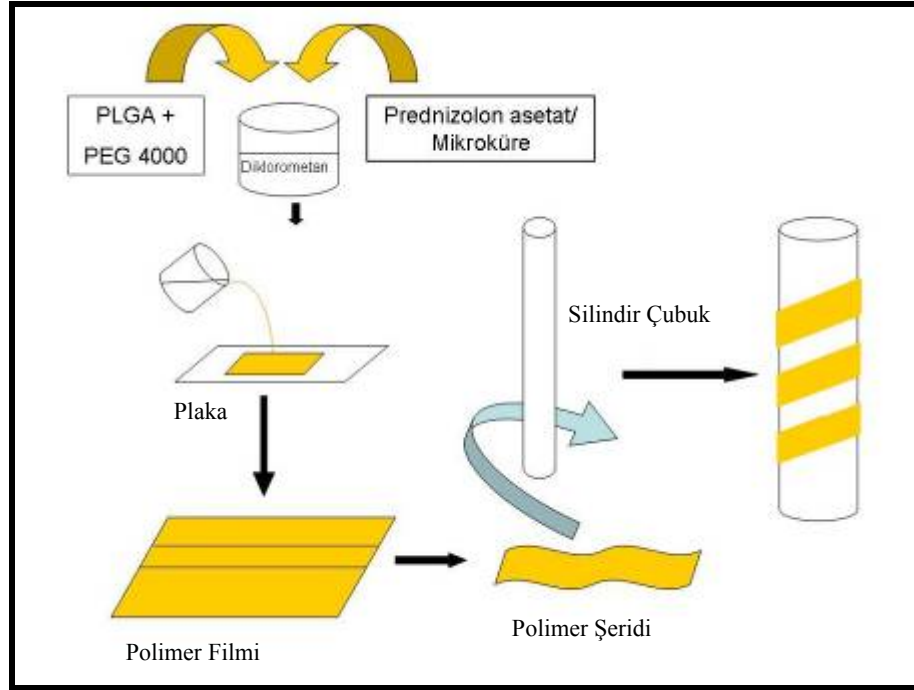
Şekil 3.3. Biyoparçalanır stentlerin hazırlanmasının şematik gösterimi

3.2.6.4. Etkin Madde ve Mikroküre İçeren Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması

Prednizolon asetat içeren stentlerin hazırlanması için uygulanan işlemler Bölüm 3.2.6.3’de anlatılan yöntemle uyum içindedir. Plastizer içeren polimer çözeltileri hazırlandıktan sonra stentlerin her biri lokal antiinflamatuvar etkinin görüldüğü doz olan 1 mg prednizolon asetat içerecek şekilde miktarı ayarlanan prednizolon asetat hassas terazide tartılarak polimer çözeltisine ilave edilmiştir. Homojen bir şekilde karışmasının sağlanması için çözelti 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmış sonrasında etkin madde içermeyen stent hazırlanması için uygulanan işlemler aynı sırayla etkin madde içeren polimer çözeltilerine de uygulanmıştır. Bu işlemlerin sonunda etkin madde olarak prednizolon asetat içeren

biyoparçalanır kardiyovasküler stent yapıları hazırlanmıştır. Etkin madde içeren stentlerin hazırlanmasına ilişkin üretim şeması Şekil 3.4’de gösterilmiştir.

Tez çalışmamızda ayrıca biyoparçalanır stentlere prednizolon asetat içeren kitosan mikroküreleri de eklenmiştir. Böylece sadece prednizolon asetat içeren stentlerin yanı sıra mikroküre içeren stentler de hazırlanarak bu iki stent yapısı karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, yukarıda anlatılan prednizolon asetat içeren stentlerin üretiminde kullanılan yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde yapılan değişiklikle polimer çözeltilerine prednizolon asetat yerine prednizolon asetat içeren kitosan mikroküreleri karıştırılmıştır. Stentlere karıştırılacak olan mikroküre formülasyonu, mikroküreler üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları ve özellikle in vitro salım süreleri gözönüne alınarak seçilmiştir. Buna göre kullanılan mikroküre formülasyonu CM1PA20 kodlu [% 1 (a/a) oranında kitosan orta molekül ağırlıklı polimeri ve polimerin % 20’si (a/a) oranında prednizolon asetat içeren mikroküre] formülasyondur. Stent başına 1 mg prednizolon asetat içeren mikroküre tartılarak polimer çözeltisine eklenmiş ve stent hazırlama işlemleri tekrar edilmiştir. Mikroküre içeren stentlerin hazırlanmasında kullanılan yöntem şematik olarak Şekil 3.4’de gösterilmiştir. Tablo 3.4’de hazırlanan prednizolon asetat ve prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren biyoparçalanır stent formülasyonlarının içerikleri verilmiştir.



Şekil 3.4. Etkin madde ve mikroküre içeren biyoparçalanır stentlerin hazırlanmasının şematik gösterimi

Tablo 3.4. Prednizolon asetat ve prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren biyoparçalanır stent formülasyonları ve bileşenleri

Formülasyon Kodu	Kullanılan Polimer Tipi	Prednizolon asetat	Prednizolon asetat İçeren Mikroküre*
S1	PLGA (75:25)	+	-
S2	PLGA (75:25)	-	+
S3	PLGA (50:50)	+	-
S4	PLGA (50:50)	-	+

*CM1PA20 kodlu mikroküre formülasyonu kullanılmıştır.

3.2.7. Hazırlanan Biyoparçaların Stentlerin Karakterizasyonu

3.2.7.1. Polimer Filmlerinin Şişme ve Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.6.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) filmlerinin sulu ortamda şişme ve su absorplama özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanmış olan altı adet film şeridinin ağırlıkları hassas terazide tartılmış ve kaydedilmiştir. Bu işlemi takiben şeritler 10 mL salım ortamı (% 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) tamponu) içeren flakonlara konmuş ve flakonlar 37 °C’deki su banyosuna yerleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (2., 3., 4., 5., 6., 8., 12. ve 15. günler) polimer filmi şeritleri ortamdan çıkartılmış, bir kurutma kağıdı yardımıyla şerit üzerinde kalmış olan damlalar dikkatlice uzaklaştırılmış ve tekrar tartılmışlardır. Aşağıda verilen formül yardımıyla polimerik film şeritlerinin su absorplama yüzdeleri bulunmuştur (156,163,164).

$$\text{Su absorplama (\%)} = (A-B) / B \times 100 \quad (\text{Formül 3.3})$$

A: Film şeridinin ilk ağırlığı (g)

B: Film şeridinin su absorpladıktan sonraki ağırlığı (g)

3.2.7.2. Hazırlanan Polimer Filmlerinin ve Stentlerin Kalınlık Kontrolü

Üretilen polimer filmlerinin ve stentlerin kalınlıklarının ölçümü kompas ve Leica 320 DFC optik mikroskobu yardımıyla yapılmıştır. Her bir stentin kalınlığı iki ucundan ve ortasından ölçülmüş ve bu üç ölçüm değerinin ortalaması istatistiksel olarak bir stentin kalınlığı olarak kaydedilmiştir. Bu şekilde oniki adet stentin kalınlıklarının ortalaması alınarak, SS ve VK ile birlikte verilmiştir.

3.2.7.3.Hazırlanan Stent Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Hazırlanmış olan stentlerin şekilsel özelliklerinin ve yüzey yapısının incelenmesi için SEM kullanılmıştır (9,154-156,163,165). Üretilen biyoparçalanır stentler SEM analizinde kullanılan pirinç plakalar üzerine sabitlenmişlerdir. Sabitleme yerlerinden gümüş boyasıyla dikkatlice boyanan stentler, kaplama düzeneğinde (Hummle VII Sputter Coating Device, Anatech) yaklaşık 150Å kalınlığında altınla kaplanmış ve sonrasında görüntüleme amacıyla değişik büyütme oranlarında fotoğraf çekimi yapılarak yüzey özellikleri araştırılmıştır. Stentlerin genel şekilsel özelliklerinin incelenmesi amacıyla ise dijital fotoğraf makinası ile (HP, 5,1 Megapixel) fotoğraflar çekilmiştir.

3.2.7.4. Biyoparçalanır Stentlerden Prednizolon Asetatın İn Vitro Salım Çalışması

Bölüm 3.2.6.4’de açıklandığı şekilde üretilen biyoparçalanır kardiyovasküler stentlerden prednizolon asetatın salım özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla üretilen stent formülasyonlarının her biri için altı adet prednizolon asetat ya da prednizolon asetat kitosan mikroküre formülasyonu (CM1PA20) içeren stent alınmış ve 2 mL’lik Eppendorf tüplerine konmuştur. Tüplerin her birine 2 mL % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisi salım ortamı olarak eklenmiş ve bu salım hücreleri hızı 50 rpm’e ayarlanmış olan yatay çalkalayıcı su banyosuna (37 °C) yerleştirilmiştir. Belirlenmiş olan zaman noktalarında (1., 3., 5., 10., 18., 21., 28., 32., 40., 49., 56., 63., 70. ve 77. günler) Eppendorf tüpleri alınmış ve içlerindeki stentler çıkartılarak, 2 mL taze salım ortamı içeren Eppendorf tüplerine konmuştur (50,76). Stentlerin yer aldığı yeni salım tüpleri tekrar su banyosuna yerleştirilmiş ve çalkalanmaya bırakılmıştır (77,93). Alınan örnekler spektrofotometrik olarak analiz edilmiş ve 247 nm’deki absorbans değerleri kaydedilmiştir (73,94). Her bir zaman noktası için salınan prednizolon asetatın % kümülatif miktarı hesaplanmış ve grafiğe geçirilerek sunulmuştur.

Biyoparçalanır stentlerden prednizolon asetatın in vitro salım deneylerinin validasyonu için Bölüm 3.2.5.6.1’de verilen yöntem uygulanmıştır. S1-S4 stent formülasyonları için örnek alınan her bir zaman noktasında, altışar adet salım hücresinden elde edilen etkin madde miktarları X, SS ve VK değerleri ile hesaplanmıştır. Değerlendirme yapılırken VK değerlerinin % 5’den fazla olmaması göz önünde tutulmuştur.

3.2.8. Etkin Madde İçeren Kaplı Stent Formülasyonlarının Hazırlanması

3.2.8.1. Metalik Stentlerin Biyoparçalanır Polimerlerle Kaplanması

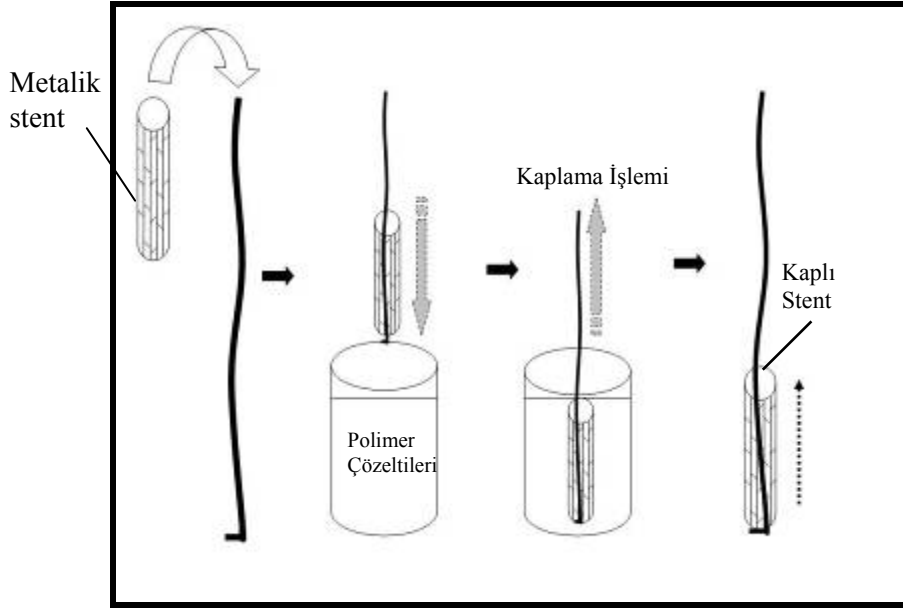
Piyasalarda kullanımda olan metalik stentlerin kaplama yapılarak ilaç salan stent haline getirilebilmesi amacıyla NEMED firmasından elde edilen metalik stentler (çıplak stent) öncelikle biyoparçalanır PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerleriyle kaplanarak, kaplama işlemi üzerinde ön formülasyon geliştirme çalışmaları yapılmıştır (21,166). Yapılan ön formülasyon çalışmalarından sonra optimize edilen kaplama işlemine ilişkin kullanılan yöntem Şekil 3.5’de gösterilmiştir. Buna göre öncelikle diklorometan içinde % 25 (a/h) oranında PLGA (75:25) veya PLGA (50:50) polimerleri içeren çözeltiler hazırlanmış ve polimer çözüldükten sonra bu çözeltilere % 0,5 (a/h) oranında PEG 4000 eklenmiştir. Etkin madde içermeyen stentlerin kaplanması amacıyla kullanılacak olan bu çözeltiler 1,5 mL hacminde ve 2 cm yüksekliğinde ağzı vida kapalı cam flakonlara alınmış ve kaplama çözeltisi hazır hale getirilmiştir. Kaplanacak olan stentler, iç çaplarından küçük bir çapa sahip (0,8 mm) olan 10 cm uzunluğundaki metal tellere geçirilmiştir (166). Tellerin ucu stentin telden çıkmaması için 90° bükülü konumda bırakılmıştır. Bu şekilde tele yerleştirilen stent, kaplama çözeltisinin bulunduğu flakona daldırılmış ve 5 saniye boyunca bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda tel ve beraberinde üzerine takılı durumda olan stent flakondan çıkarılmıştır. Ucu sivri bir pens yardımıyla üzerinde ve içinde polimer çözeltisi olan stent tel üzerinde telin diğer ucuna doğru yavaş ve dikkatlice itirilmiş ve telden çıkartılan stent aynı özellik ve boyutlardaki başka bir tele yerleştirilmiştir. Sıcaklığı 30 °C’de sabit tutulan bir kurutma tabancası (ısıtma ve soğutma kontrollü, sabit hızda sıcak hava veren) bankoya sabitlenmiş ve

telin üzerindeki stent ısı tabancasından 30 cm uzaklıkta tutularak ön kurutma işlemi yapılmıştır. Bu sırada stentin üzerindeki polimer tabakasından diklorometanın homojen bir şekilde uzaklaşabilmesi için tel kendi etrafında döndürülmüştür (50,80). 1 dakika boyunca ısı tabancası kullanılarak kurutulan stentler, 40 °C'deki etüve konularak diklorometanın tamamen uzaklaşması için iki gün boyunca etüvde tutulmuştur (163). İkinci günün sonunda etüvden alınan stentler karakterizasyon ve in vitro salım çalışmalarında kullanılmak üzere oda sıcaklığında, desikatörde saklanmıştır.

3.2.8.2. Stentlerin Etkin Madde ve Mikroküre İçeren Polimer Çözeltileriyle Kaplanması

Stentlerin etkin madde ve mikroküre içeren polimer çözeltisi ile kaplanması çalışmalarında iki grup tasarlanmıştır. Birinci grupta prednizolon asetat (1 mg/stent), ikinci grupta ise prednizolon asetat içeren (1 mg) mikroküre formülasyonu, kaplama amacıyla hazırlanmış olan polimer çözeltilerine eklenmiştir. Literatürde polimer kaplı stentlerin hazırlanması amacıyla kullanılan kaplama yöntemleri (21,73,79,80,167-169) arasından Jayaraman ve arkadaşlarının (166) yöntemi modifiye edilerek prednizolon asetat içeren ve prednizolon asetat yüklü mikroküre içeren biyoparçalanır polimer dispersiyonları hazırlanarak formülasyonlar elde edilmiştir.

Prednizolon asetat salan kaplı stent yapılarının hazırlanması için Bölüm 3.2.8.1'de verilen yöntem uygulanmıştır. Buna göre polimerik kaplama çözeltisi hazırlanmış ve etkin madde içeren kaplama yapılması için, stent başına 1 mg prednizolon asetat hassas terazide tartılarak polimer çözeltilerine eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı kullanılarak homojen bir karışım elde edilmiş ve stentlerin kaplanması için Bölüm 3.2.8.1'de verilen işlemler tekrar edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Stentlerin polimer çözeltileri (PLGA 75:25 veya PLGA 50:50) kaplanması sırasında takip edilen işlemlerin şematik gösterimi

Biyoparçaları polimerlerle hazırlanan kaplama çözeltisi içine prednizolon asetat içeren kitosan mikroküreleri de (CM1PA20 formülasyonu) yukarıda anlatılan işlemler uygulanarak karıştırılarak ikinci grup ilaç salan stent formülasyonları hazırlanmıştır.

3.2.9. İlaç Kaplı Stent Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Etkin madde salan kaplı stent formülasyonlarının karakterizasyonu amacıyla literatürde belirtilen SEM ile yüzey özellikleri ve kaplama etkinliği değerlendirmesi (154,163,170), stentlerin açılma kontrolü (73,163), kaplama kalınlığı (50,80) ve in vitro salım değerlendirmesi deneylerinden aşağıda ayrıntıları belirtilen çalışmalar yapılmıştır.

3.2.9.1. Kaplı Stentlerin Açılma Kontrolü

Etkin madde ve prednizolon asetat yüklü mikroküre içeren biyoparçaları polimerler ile stentlerin kaplanması işlemi sonrasında stentin anjioplasti balonu ile açılması sırasındaki dayanıklılığının incelenmesi için stentlere açılma kontrolü

yapılmıştır. Kaplı stentlerin kullanımları sırasında karşılaştıkları fiziksel zorlamaların son üründe yapacağı etkilerin değerlendirilmesi için kaplama yapılmış olan stentler anjioplasti balonlarının üzerine yerleştirilmiştir. Balonu şişirmek için kardiyoloji kliniklerinde rutin olarak kullanılan balon şişirme cihazı ile 8 bar basınç uygulanarak açılmışlardır. Bu işlem sırasında polimer tabakasında meydana gelen değişimler optik mikroskop yardımıyla görsel olarak incelenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir (163).

3.2.9.2. Kaplı Stentlerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

SEM ile görüntüleme tekniği kullanılarak stentler üzerine yapılan kaplama işleminin etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla stentler ve kaplama yapılmış olan stent formülasyonları pirinç plakalar üzerine sabitlenmiştir. Sabitleme yerlerinden gümüş boyasıyla hassasiyetle boyanan stentler, kaplama cihazı (Hummle VII Sputter Coating Device, Anatech) yardımıyla altınla kaplanmıştır. Bu yapıların SEM cihazı aracılığı ile değişik büyütme oranlarında fotoğrafları çekilmiş ve yüzey özellikleri incelenmiştir.

3.2.9.3. Prednizolon Asetat ve Prednizolon Asetat Yüklü Mikroküre İçeren Polimerlerle Kaplı Stentlerden İn Vitro Salım Çalışmaları

Kaplama yapılan stent formülasyonlarından etkin madde salımının incelenmesi için Bölüm 3.2.7.4’de verilen in vitro salım yöntemi kullanılmıştır. Salınan prednizolon asetatin miktar tayini için UV spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır.

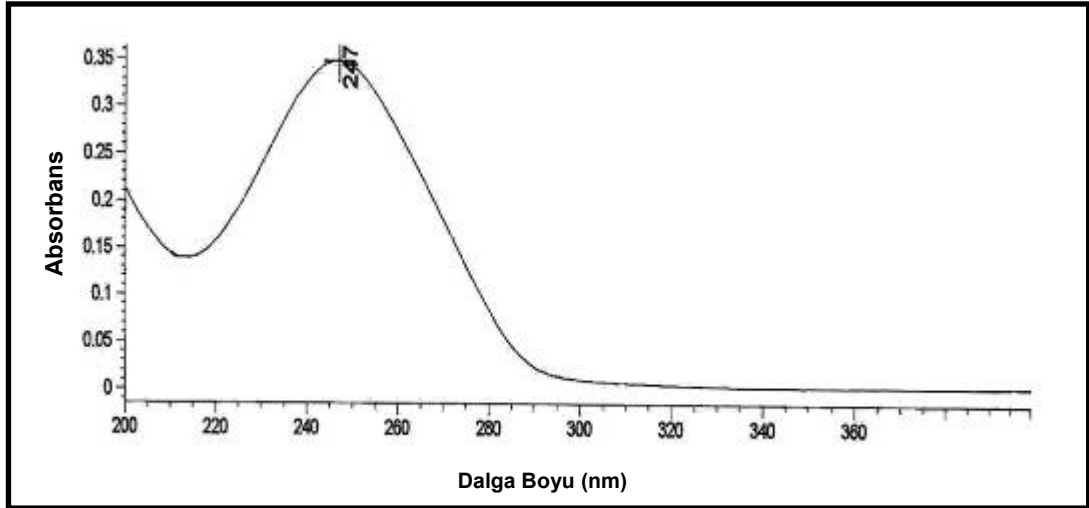
Zamana karşı elde edilen % kümülatif salınan prednizolon asetat miktarları grafiğe geçirilmiştir. Salım deneyleri sonunda formülasyonlar arasındaki fark varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İn vitro salım deneylerinin validasyonu için ise Bölüm 3.2.5.6.2’de verilen parametreler araştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Prednizolon Asetatın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalara İlişkin Bulgular

4.1.1. UV Spektrumu

Prednizolon asetatın UV spektrumu % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisi içinde çekilmiştir. Bu çözücü içinde maddeye ilişkin maksimum dalga boyu ($\lambda_{\max}$) 247 nm’de gözlenmiş olup Şekil 4.1’de gösterilmektedir.

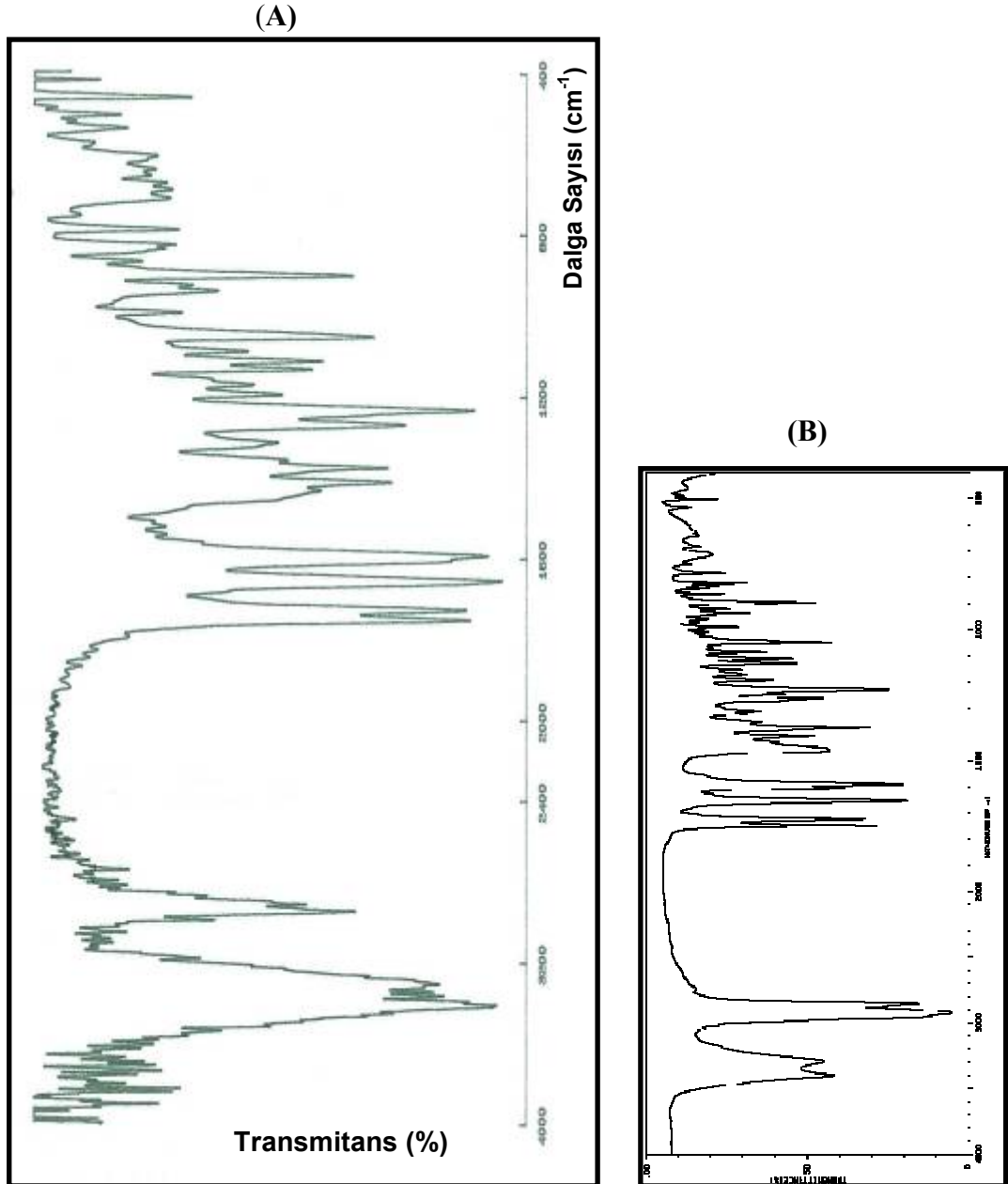


Şekil 4.1. Prednizolon asetata ilişkin UV spektrumu

4.1.2. FT-IR Spektrumu

Prednizolon asetatın Bölüm 3.2.1.2’de anlatıldığı şekilde çekilen FT-IR spektrumu Şekil 4.2’de gösterilmektedir. FT-IR spektrumunda gözlenen absorpsiyon bantları, prednizolon asetata ilişkin referansta yer alan absorpsiyon bantlarıyla uyum içindedir. 3400-3600 cm^{-1} arasında görülen iki tepeli pik, moleküldeki iki alkol gurubunda yer alan R-OH bağı gerilim bantlarıdır. 2850-3100 cm^{-1} arasında C-H gerilim bantlarını temsil eden pik, 1770-1710 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ise keton ve ester yapısındaki C=O gerilim titreşimi pikleri görülmektedir. 1600 cm^{-1} dalga

sayısındaki pik prednizolon asetatın yapısındaki C=C bağlarının gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1300-1050 cm^{-1} dalga sayısında görülen keskin pik C-O bağının gerilim titreşimi pikidir. 810-750 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki pik sübstitüe aromatik halka yapısındaki C-H eğilme titreşimi, 995-910 cm^{-1} aralığındaki keskin pik de HC=CH yapısındaki çifte bağ eğilme titreşimini ifade etmektedir.



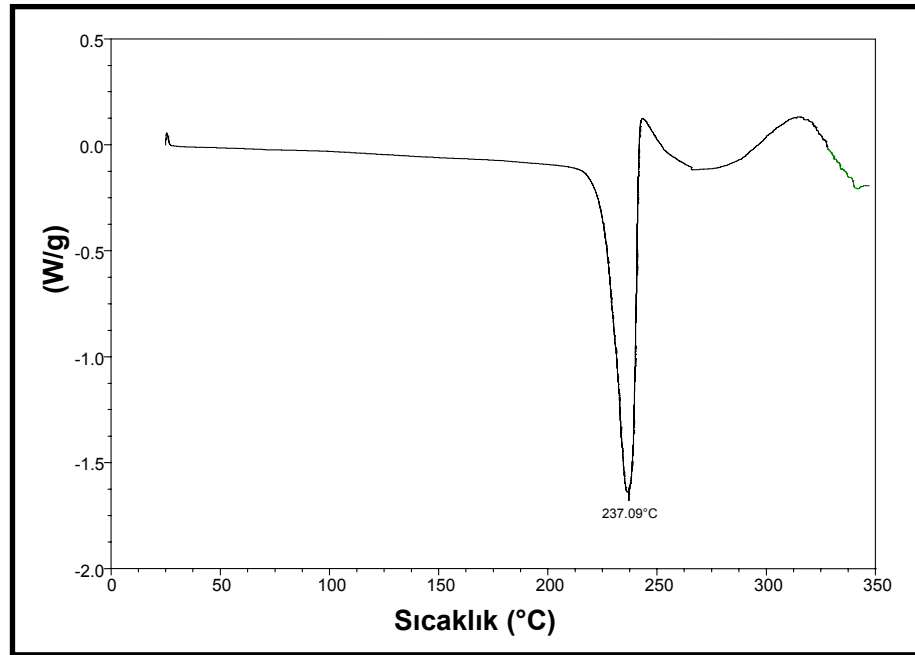
Şekil 4.2. Prednizolon asetata ilişkin IR spektrumu
A: Çekilen spektrum, B: Referans (171)

4.1.3. Erime Derecesi Tayini

Prednizolon asetatın erime derecesi tayini Bölüm 3.2.1.3’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve erime derecesi 235 – 236 °C olarak bulunmuştur. Bu değerler referans kaynaklarda prednizolon asetat için verilen değerler ile uyum içindedir (126,127).

4.1.4. DSC Termogramı

Prednizolon asetatın DSC termogramı Bölüm 3.2.1.4’de belirtilen cihaz ve yöntem kullanılarak çekilmiştir. Elde edilen termogram Şekil 4.3’de gösterilmektedir. Grafikteki keskin endotermik pik, prednizolon asetatın erime derecesine ilişkin olup 237,09 °C değerinde elde edilmiştir. Prenizolon asetat için DSC yöntemiyle bulunan erime derecesi de kaynaklarda verilen referanslarla uyum içindedir (126,127).

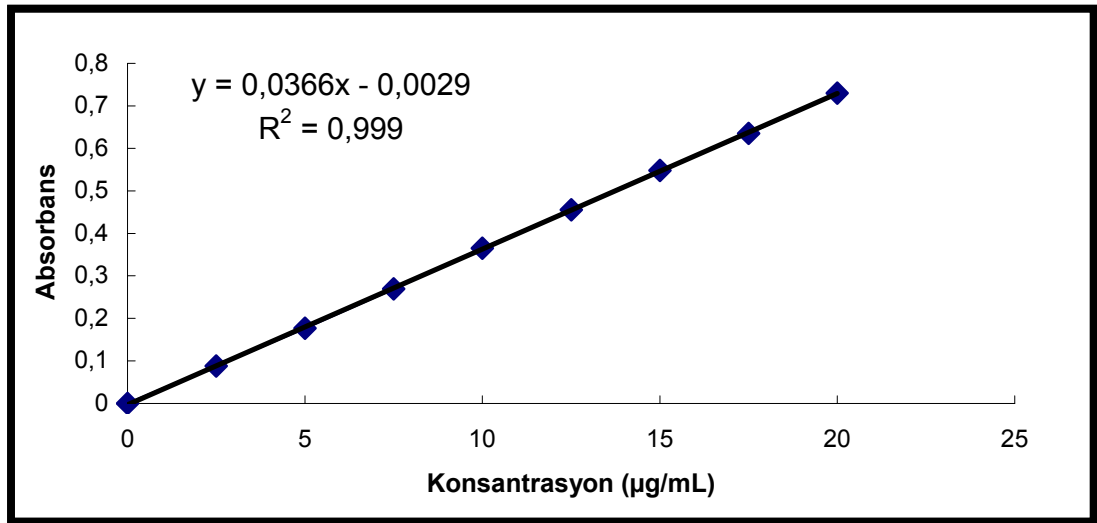


Şekil 4.3. Prednizolon asetatın DSC termogramı

4.2. Prednizolon Asetatın Spektrofotometrik Miktar Tayini

4.2.1. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması

Prednizolon asetatın % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisindeki kalibrasyon doğruları, UV spektrofotometrik yöntem kullanılarak, Bölüm 3.2.2.1’de anlatıldığı şekilde oluşturulmuştur. Altı seriden sekiz farklı konsantrasyon değeri için bulunan absorbans değerleri kullanılarak, konsantrasyona karşı absorbans grafikleri elde edilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen kalibrasyon doğru denklemleri Microsoft® Office Excel 2003 programı yardımıyla lineer regresyon analizi kullanılarak hesaplanmıştır. Prednizolon asetatın % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.4’de verilmektedir.



Şekil 4.4. Prednizolon asetatın % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6)

4.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

4.2.2.1. Özgünlük

Bölüm 3.2.2.2.1’de anlatıldığı üzere etkin madde içeren mikroküre ve stent formülasyonlarının yanı sıra, aynı formülasyonların etkin madde içermeyen şekilleri de hazırlanmış ve salım ortamını ile etanolde ayrı ayrı $\lambda=200\text{--}400\text{ nm}$ aralığında UV spektrumları çekilmiştir. Prednizolon asetatın maksimum absorbands verdiği dalga boyunda çözücü bileşenleri ve formülasyona giren yardımcı maddelerin absorbands vermedikleri gözlenmiştir.

4.2.2.2. Doğrusallık

Bölüm 3.2.2.2.2’de anlatıldığı gibi 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5, 20 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarına karşı okunan absorbands değerleri grafiğe geçirilmiş ve prednizolon asetat için kalibrasyon denklemleri hesaplanmıştır. % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) ortamında elde edilen kalibrasyon denkleminin doğrusallığını belirleyen R^2 (tanımlayıcılık katsayısı) değeri 0,999 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).

4.2.2.3. Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğuna ilişkin veriler, Bölüm 3.2.2.2.3’de anlatıldığı şekilde % ortalama bağıl hatalar hesaplanarak elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusunda yer alan dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanmış olan altışar adet çözeltinin absorbandsları ölçülmüş ve ölçülen konsantrasyon ile % bağıl hatalar Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Doğruluk analiz sonuçları (n=6)

Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL) X±SS*	% Ortalama Bağlı Hata
5	4,99±0,09	0,12
10	10,01±0,09	0,07
15	15,67±0,11	4,46
20	20,63±0,16	3,14

* X: Ortalama, SS: Standart Sapma

4.2.2.4. Kesinlik

Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi için Bölüm 3.2.2.2.4’de belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan beş ayrı standart çözeltinin absorbansları ayrı ayrı altışar kez üst üste okunarak kaydedilmiştir. Bu değerlerden hareketle kalibrasyon doğrusu kullanılarak hesaplanan etkin madde konsantrasyonları arasındaki varyasyon katsayısı hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Hesaplanan varyasyon katsayılarının hepsi % 2’den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.2. Prednizolon asetat için analitik yöntemin tekrar edilebilirlik sonuçları

Hazırlanan Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL) X±SS*	Varyasyon Katsayısı (%)
2,5	2,50±0,03	1,36
5	4,89±0,07	1,40
10	10,20±0,10	1,00
15	15,00±0,06	0,37
20	19,83±0,05	0,23

* X: Ortalama, SS: Standart Sapma

Kullanılan analitik yönteminin kesinliğini belirleyen diğer parametre olan tekrar elde edilebilirliğin hesaplanması için dört farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/mL}$) ayrı ayrı altı adet çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin absorbansları birer defa ölçülerek, her bir konsantrasyon değeri için ortalamalar hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.3’de gösterilmektedir. Tekrar elde edilebilirlik için hesaplanan varyasyon katsayılarının % 2’den küçük olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.3. Prednizolon asetat için analitik yöntemin tekrar elde edilebilirlik sonuçları

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm SS^*$	Varyasyon Katsayısı (%)
5	4,99 $\pm$ 0,09	1,73
10	10,01 $\pm$ 0,09	0,90
15	15,67 $\pm$ 0,11	0,70
20	20,63 $\pm$ 0,16	0,80

* X: Ortalama, SS: Standart Sapma

4.2.2.5. Stabilité

Prednizolon asetatın stabilitesi in vitro salım deneyleri süresince takip edilmiştir. Bu amaçla Bölüm 3.2.2.2.5’de verildiği şekilde % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisi içerisinde 15 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki prednizolon asetat çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ sıcaklıkta 50 rpm’de çalışan yatay çalkalayıcıda iki ay boyunca bekletilmiş, mikroküreler için ilk 15 gün, biyoparçalanır ve kaplı stentler için ise 60 gün boyunca belirlenen zaman noktalarında örnekler alınmıştır. Örneklerdeki etkin madde miktarı $\lambda_{\text{max}} = 247 \text{ nm}$ ’de ölçülmüştür. Günler arasında elde edilen % kalan prednizolon asetat miktarında herhangi bir kayıp tespit edilmemiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Prednizolon asetatın in vitro salım ortamında ve koşullarında stabilite sonuçları (n=6)

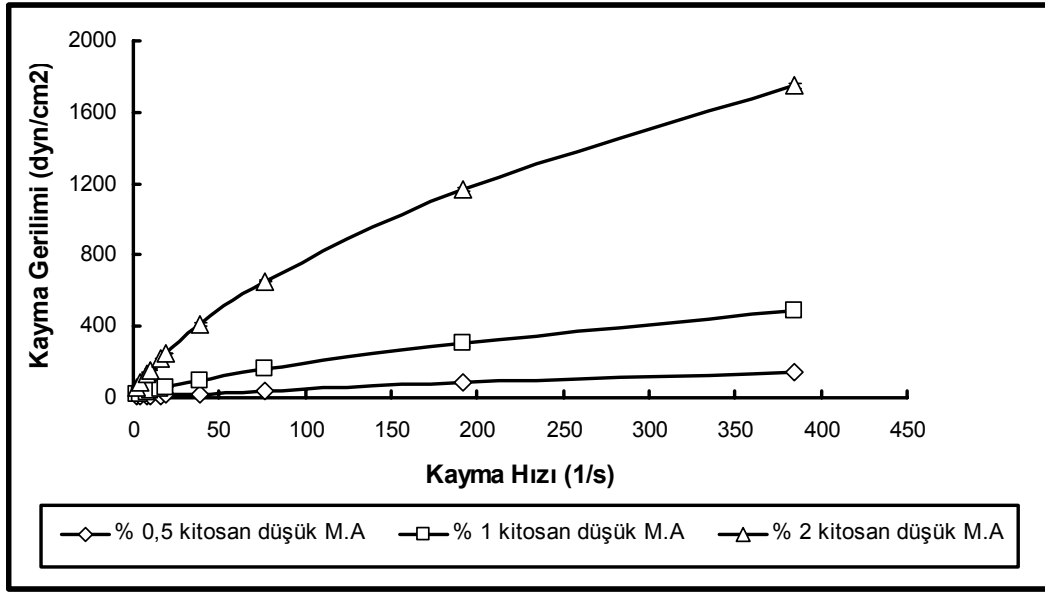
Zaman (gün)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$, $\bar{X} \pm \text{SS}^*$)	% Kalan Prednizolon asetat
1	15	$15,00 \pm 0,01$	100,0
3	15	$15,00 \pm 0,05$	100,0
5	15	$15,01 \pm 0,04$	100,1
7	15	$15,03 \pm 0,06$	100,2
10	15	$15,00 \pm 0,03$	100,0
15	15	$15,03 \pm 0,01$	100,2
21	15	$15,01 \pm 0,02$	100,1
28	15	$15,00 \pm 0,04$	100,0
35	15	$15,03 \pm 0,06$	100,2
42	15	$15,02 \pm 0,03$	100,1
49	15	$14,87 \pm 0,06$	99,1
60	15	$14,34 \pm 0,10$	99,1

*X: Ortalama, SS: Standart Sapma

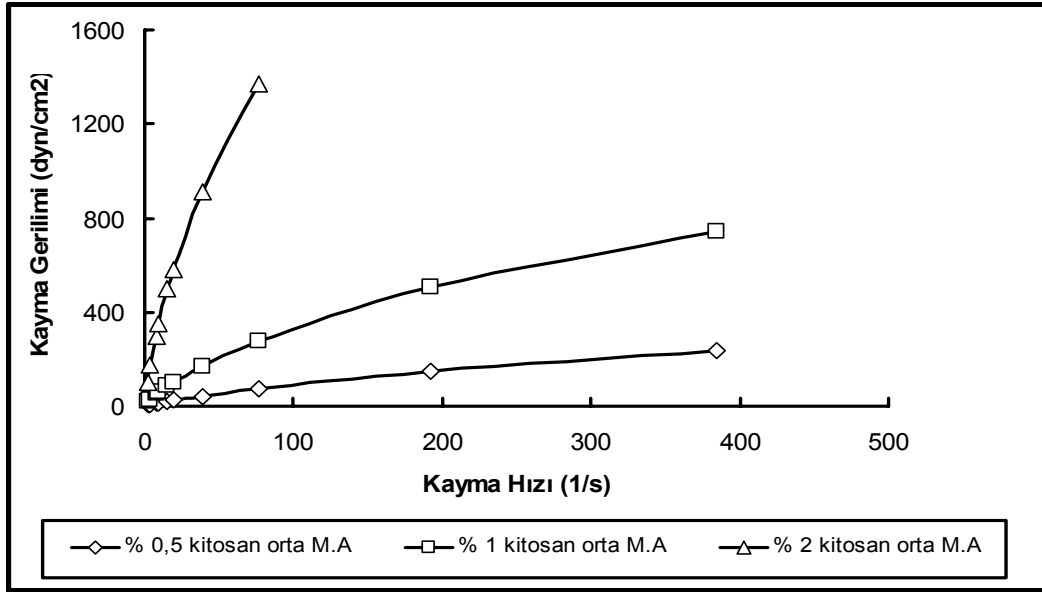
4.3. Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

4.3.1. Viskozite Çalışmaları

Bölüm 3.2.3.1’de anlatıldığı şekilde % 0,5, 1 ve 2’lik (a/h) orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan çözeltilerinin değişik dönme hızlarında kayma hızına karşı kayma değerleri grafiğe geçirilerek Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Ayrıca kitosan çözeltilerinin gösterdikleri reolojik akış tipi değerlendirilmiştir. Her bir kitosan çözeltisi için 25 ± 2 °C’de ve $76,8 \text{ sn}^{-1}$ kayma hızındaki viskozite değerleri Tablo 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. Düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin reogramları (n=3)



Şekil 4.6. Orta molekül ağırlıklı kitosan polimerinin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin reogramları (n=3)

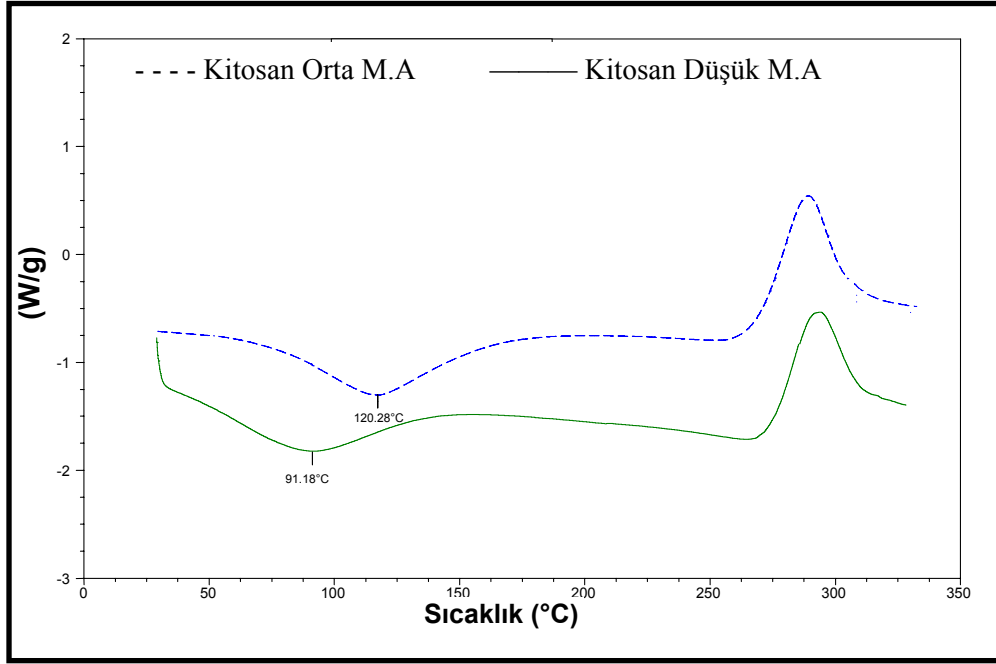
Şekil 4.5-6’da görüleceği üzere orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan çözeltileri % 0,5, 1 ve 2 (a/h) konsantrasyonlarda psödoplastik akış özelliği göstermektedir. Doğal bir polimer olan kitosanın farklı molekül ağırlığında ve farklı konsantrasyonlarında elde edilen bu akış tipi; kayma hızı arttıkça viskozitedeki artışı ifade etmektedir. Farklı molekül ağırlığına sahip kitosan polimerleri için akış tipi aynı olmasına rağmen viskoziteleri birbirinden oldukça farklıdır. Psödoplastik akış özelliği göstermesi nedeniyle farklı konsantrasyondaki kitosan çözeltilerinin viskozite değerleri tek bir viskozite değeriyle ifade edilemediği için 25 ± 2 °C ve $76,8 \text{ sn}^{-1}$ kayma hızındaki viskozite değerleri karşılaştırılmış ve viskozite değerleri arasındaki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Standart sapma değerlerinin düşük oluşu grafikte görülmelerini engellemektedir.

Tablo 4.5. Kitosan çözeltilerinin 25 ± 2 °C ve $76,8 \text{ sn}^{-1}$ kayma hızındaki viskozite değerleri (n=3)

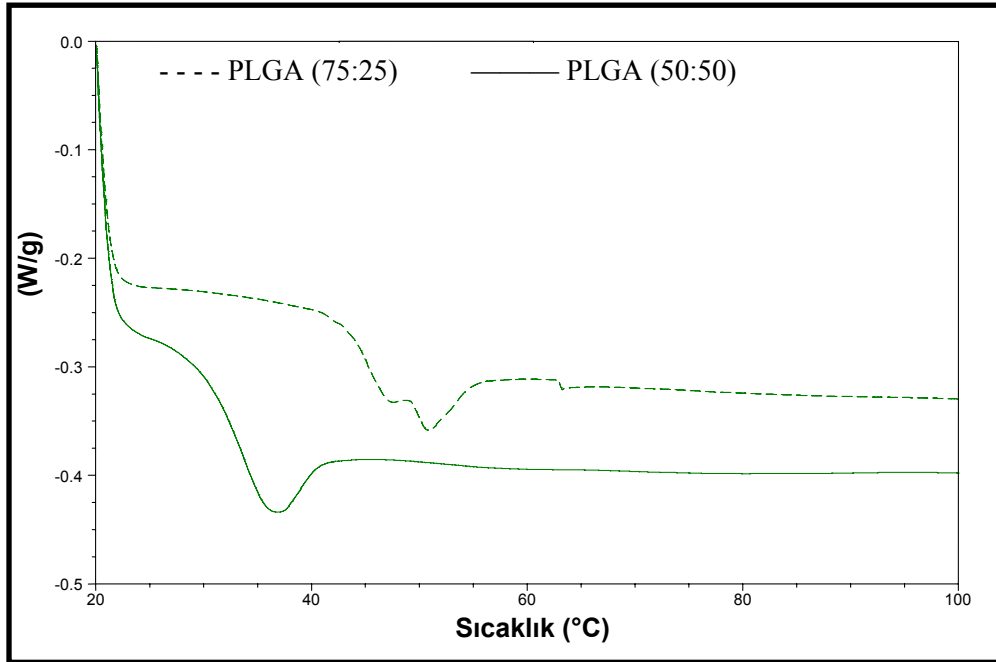
Kitosan Tipi (M.A)	Polimer Konsantrasyonu (%)	Viskozite (miliPascal.saniye) $\bar{X} \pm SS$
Orta	0,5	$97,3 \pm 2,0$
Orta	1	$363,5 \pm 11,6$
Orta	2	$1782,1 \pm 48,9$
Düşük	0,5	$52,9 \pm 1,2$
Düşük	1	$205,6 \pm 8,2$
Düşük	2	$853,3 \pm 7,9$

4.3.2. DSC Termogramlarının İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanan polimer örnekleri DSC ile analiz edilmişlerdir. Kullanılan polimerlerin termal analizlerine ilişkin grafikler Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerlerine ilişkin DSC termogramları



Şekil 4.8. PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimerlerine ilişkin DSC termogramları

Şekil 4.7’de verildiği üzere kitosan polimerlerinin DSC termogramlarında 100 °C civarında yayvan olarak gözlenen pik polimer yapısının içindeki suyun uzaklaşması sonucunda ortaya çıkmaktadır (113).

Şekil 4.8’de verildiği üzere camsı geçiş sıcaklıklarını (T_g) gösteren pikler; PLGA (50:50) için yaklaşık 37 °C’de, PLGA (75:25) polimeri için ise yaklaşık 50 °C’de gözlenmiştir (76).

4.4. Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması

4.4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında öncelikle mikropartiküllerin üretim verimini artırmak ve küresel partiküller üretmek için düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan polimer çözeltilerinin farklı konsantrasyonları denenmiştir. Kitosanın molekül ağırlığına bağlı olmaksızın yüksek polimer konsantrasyonu (% 2) seçildiğinde elde edilen kitosan çözeltisinin viskozitesinin yüksek olması püskürterek kurutma cihazındaki iğnenin ucunun tıkanmasına ve mikroküre üretilmemesine yol açmıştır. Düşük polimer konsantrasyonu (% 0,1) seçildiğinde ise düşük üretim verimi (< % 10) ve birbirlerine yapışan mikropartiküller gözlenmiştir.

Polimer konsantrasyonu olarak, püskürterek kurutma tekniği için literatürde sıklıkla çalışılan % 1 ve % 0,5 (a/h) konsantrasyonlarına karar verilmiş ve bu konsantrasyonlardaki polimer çözeltileri ile hazırlanan formülasyonlar üzerinde in vitro karakterizasyon ve salım çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan mikrokürelerin küresel yapılar gösterdiği ve üretim verimlerinin yüksek (% 27,7 - % 53,1) olduğu tespit edilmiştir. Elde edilmiş olan bulgular Tablo 4.6’da belirtilmiştir.

Tez çalışmalarımızda, küçük partikül büyüklüklerine sahip mikroküreler elde edilebilmesi için 0,5 mm’lik iğne açıklığına sahip püskürterek kurutma başlığı seçilmiştir.

Ayrıca 1:1 oranında (h/h) alkol, diklorometan ve aseton ile karıştırılan düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan polimerlerinin % 1'lik (a/h) laktik asitteki % 1'lik (a/a) çözeltilerinde herhangi bir fiziksel geçimsizlik gözlenmemiştir.

Tablo 4.6. Kitosan mikrokürelerinin ön formülasyon çalışmalarına ilişkin bulgular

Kitosan Tipi	Konsantrasyonu (%)	Üretim Verimi (%)	Küresellik*
Orta M.A	0,1	3,4	-
Orta M.A.	0,5	25,6	+
Orta M.A	1	40,5	+
Orta M.A	2	0	-
Düşük M.A	0,1	2,7	-
Düşük M.A	0,5	27,7	+
Düşük M.A	1	53,1	+
Düşük M.A	2	0	-

* - : Küresel olmayan

+: Küresel

4.4.2. Kitosan Mikrokürelerinin Hazırlanmasında Kullanılan Faktöriyel Tasarım

2^2 faktöriyel tasarımında bağımsız değişkenlerin (% polimer konsantrasyonu (x_1) ve % hedeflenen yükleme oranı (x_2)), mikroküre formülasyonu karakterizasyonunda önemli üç parametre olan bağımlı değişkenler (ortalama partikül büyüklüğü, yüklenen prednizolon asetat miktarı ve t_{50}) üzerindeki etkileri regresyon analizleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Regresyon analizleri sonucu elde edilen fonksiyonların denklemleri (Y_1 - Y_6) orta molekül ağırlıklı kitosan ve düşük molekül ağırlıklı kitosan formülasyonları için ayrı ayrı olmak üzere Tablo 4.7 ve 8’de verilmiştir.

Y_1 - Y_3 no’lu fonksiyonlara ilişkin denklemler (Tablo 4.7) orta molekül ağırlıklı kitosan formülasyonları için sırasıyla ortalama partikül büyüklüğüne, % yükleme oranına ve t_{50} ’ye aittir.

Tablo 4.7. Orta molekül ağırlığına sahip kitosan polimeri ile hazırlanan formülasyonlara ilişkin regresyon analizi değerleri

Etkin Madde	Polimer Tipi	Denklem Kodu	Deney Parametreleri			
			β_0	β_1	β_2	B_{12}
Prednizolon asetat	Kitosan Orta M.A.	Y_1	24,880	-17,553	-1,254	1.408
		Y_2	-75,420	109,720	4.566	-3,996
		Y_3	-60,487	69,440	5,598	-3,293

Y_4 - Y_6 no’lu fonksiyonlara ilişkin denklemler (Tablo 3.8) ise düşük molekül ağırlıklı kitosan formülasyonları için sırasıyla ortalama partikül büyüklüğüne, % yükleme oranına ve t_{50} ’ye aittir.

Tablo 4.8. Düşük molekül ağırlığına sahip kitosan polimeri ile hazırlanan formülasyonlara ilişkin regresyon analizi değerleri

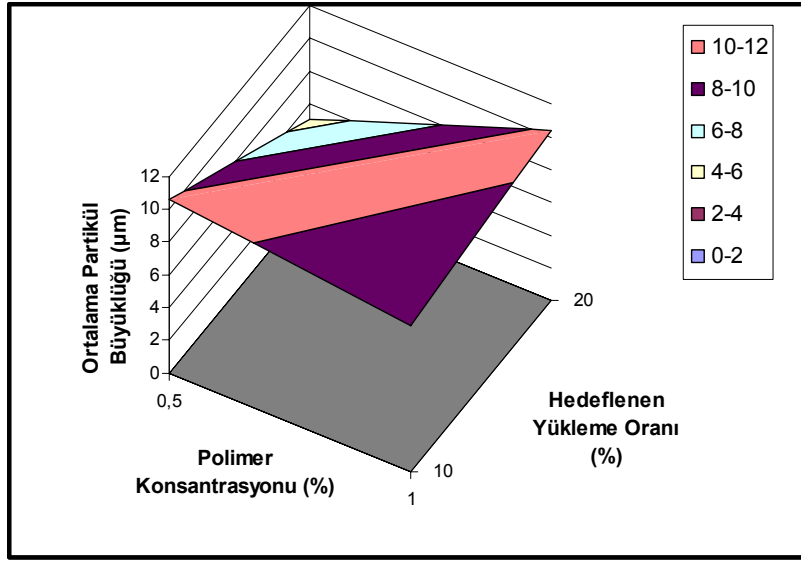
Etkin Madde	Polimer Tipi	Denklem Kodu	Deney Parametreleri			
			β_0	β_1	β_2	B_{12}
Prednizolon asetat	Kitosan Düşük M.A.	Y_4	17,44	-9,047	-0,405	0,557
		Y_5	-87,320	134,920	5,228	-5,588
		Y_6	-78,350	110,213	6,212	-4,943

Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'deki polinomial denklemler incelendiğinde, β_1 ; % polimer konsantrasyonu (x_1) ve β_2 % hedeflenen etkin madde oranı (x_2)'nın ana etkilerini göstermiştir. x_1 ve x_2 'nin çarpımı olan terim (β_{12}) bu etkenler arasındaki etkileşmeyi ifade etmektedir. Polinomial denklemlerde verilen β_0 - β_{12} terimlerinin işaretleri (+) ise bağımlı değişkenler ile pozitif yönde ilişkiyi, (-) ise negatif ilişkiyi yansıtmaktadır. Örneğin Y_1 polinomial denklemi incelendiğinde;

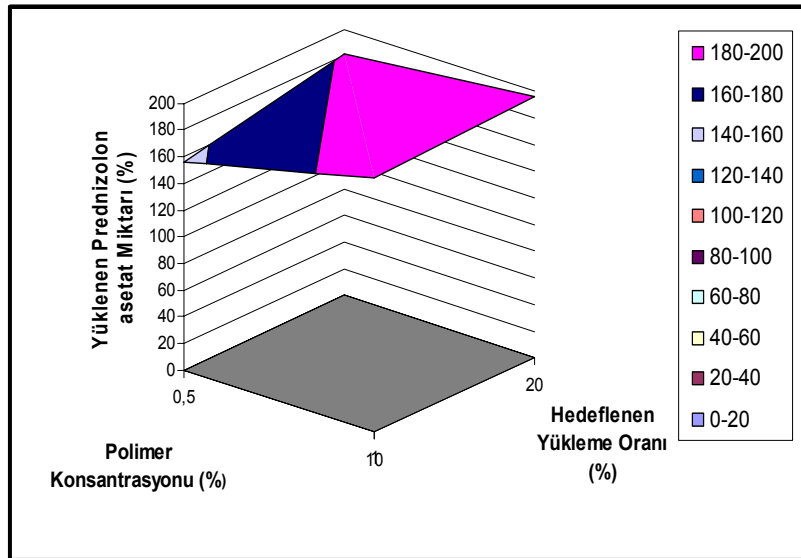
$$Y_1 = 24,880 - 17,553x_1 - 1,254x_2 + 1.408x_1x_2$$

Bağımsız değişkenler olan % polimer konsantrasyonunun (x_1) ve % hedeflenen etkin madde oranı'nın (x_2) bağımlı değişken (Y_1) olan partikül büyüklüğü üzerine etkileri negatif yöndedir ve iki etkenin düzeylerindeki artış partikül büyüklüğünde azalmaya yol açmaktadır.

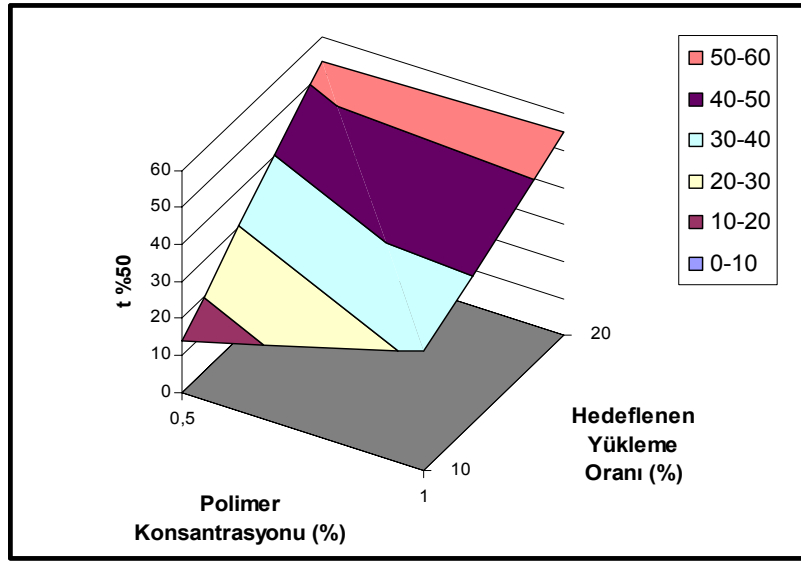
Faktöriyel tasarımda regresyon analizi sonucunda elde edilen denklemlere ilişkin cevap yüzey grafikleri çizilmiştir. Orta molekül ağırlıklı kitosan polimeri için elde edilen Y_1 - Y_3 no'lu fonksiyonlara ilişkin yüzey cevap grafikleri Şekil 4.9-11'de verilmiştir. Örnek olarak Y_1 denklemin ifade ettiği ilişkinin uzaydaki profili Şekil 4.9'da yer almaktadır. Grafik incelendiğinde polimer konsantrasyonundaki artış, düşük hedeflenen yükleme oranında (% 10) ortalama partikül büyüklüğünü ifade eden düzlemi küçük partikül büyüklüğü değerlerine doğru yöneltmiştir. Görsel olarak ilişkinin yönü ve seviyesinin incelenmesinde grafikteki renklerin karşılık geldikleri partikül büyüklüğü aralıklarından faydalanılmıştır.



Şekil 4.9. Orta molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken *ortalama partikül büyüklüğüne* ilişkin yüzey-cevap grafiği

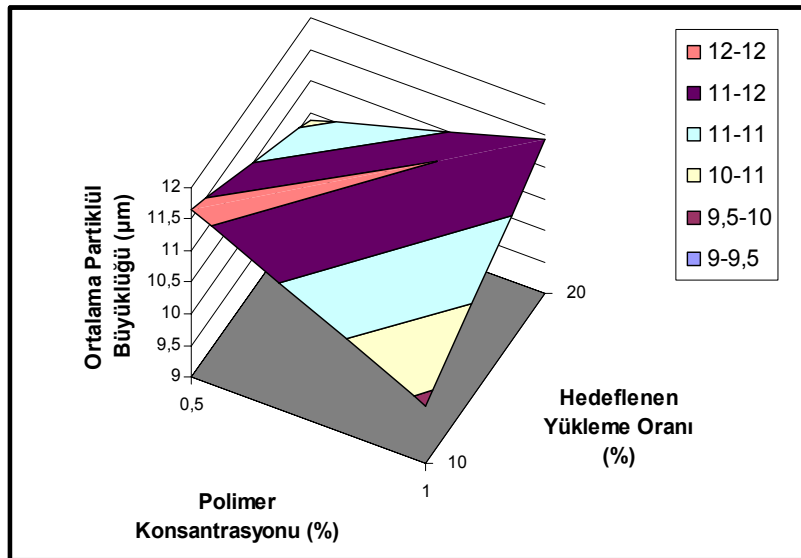


Şekil 4.10. Orta molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken *yüklenen prednizolon asetat miktarına* ilişkin yüzey-cevap grafiği

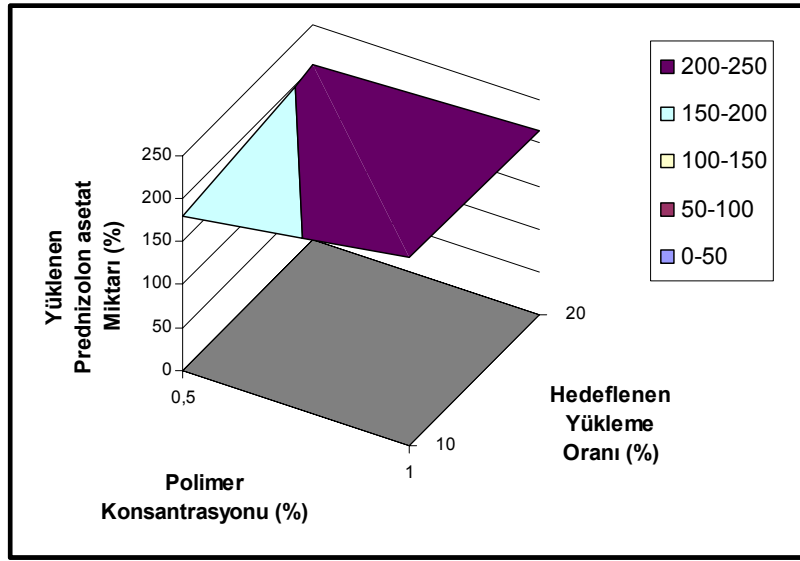


Şekil 4.11. Orta molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken $t_{\%50}$ 'ye ilişkin yüzey-cevap grafiği

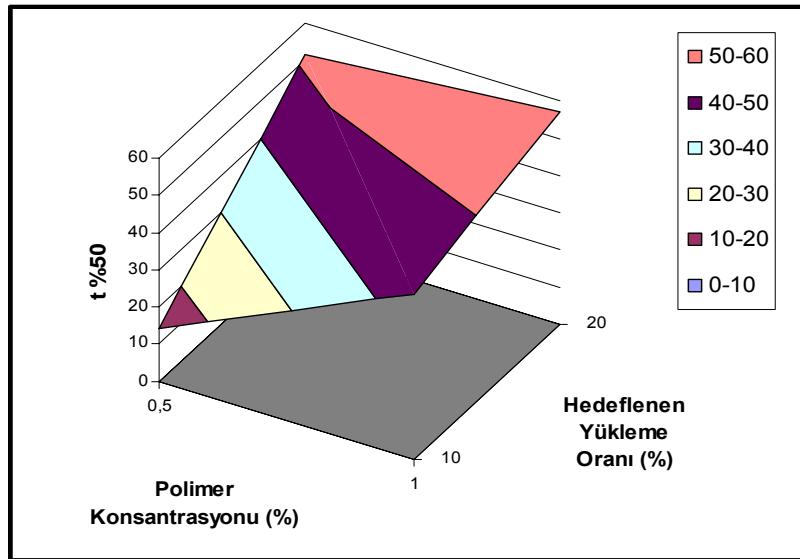
Düşük molekül ağırlıklı kitosan polimeri için elde edilen Y_4 - Y_6 fonksiyonlarına ilişkin yüzey cevap grafikleri Şekil 4.12-14'de verilmiştir. Örnek olarak etkenlerin yüklenen etkin madde miktarı üzerindeki etkisini ifade eden Y_5 denkleminde, polimer konsantrasyonu ve hedeflenen etkin madde oranındaki artış yüklenen etkin madde oranını pozitif yönde etkilemiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. Düşük molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken *ortalama partikül büyüklüğüne* ilişkin yüzey-cevap grafiği



Şekil 4.13. Düşük molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken *Yüklenen prednizolon asetat miktarına* ilişkin yüzey-cevap grafiği



Şekil 4.14. Düşük molekül ağırlıklı kitosan için bağımlı değişken t_{50} 'ye ilişkin yüzey-cevap grafiği

4.4.3. Püskürterek Kurutma Yöntemi ile Mikrokürelerin Hazırlanması

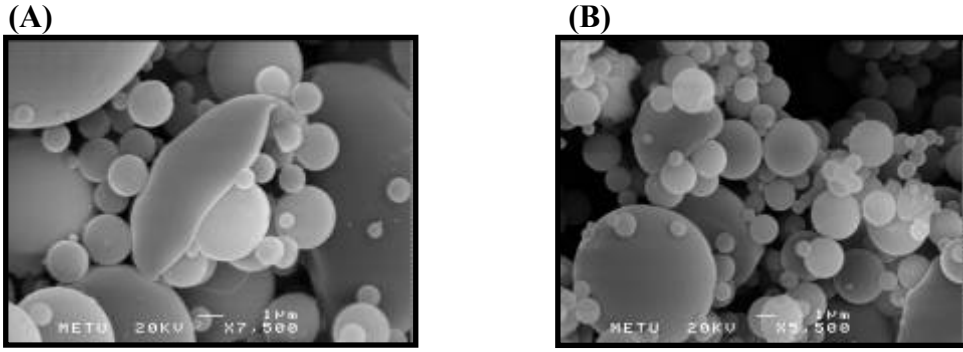
Tez çalışmamızda kullanılmak üzere hazırlanan kitosan mikroküreleri püskürterek kurutma yöntemi ile üretilmiştir. Tablo 3.3’de kodları ve bileşenleri verilen bu formülasyonların in vitro karakterizasyon çalışmaları ve salım deneyleri yapılmıştır.

4.5. Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu

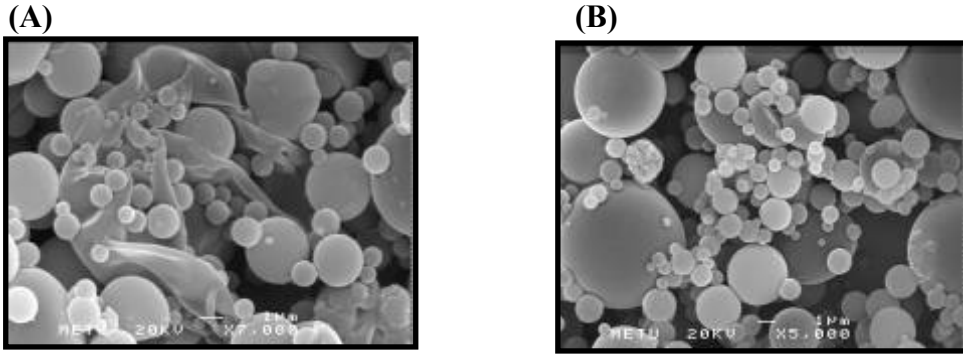
4.5.1. Morfolojik Özellikler

Üretilen etkin madde içeren ve içermeyen mikroküre formülasyonlarının yüzey özelliklerinin incelenmesinde Bölüm 3.2.5.1’de anlatılan SEM ile görüntüleme tekniği kullanılmıştır. Şekil 4.15-16’da verilen etkin madde içermeyen düşük (CL) ve orta (CM) molekül ağırlıklı mikroküre formülasyonlarının SEM fotoğraflarından homojen, yüzeyleri pürüzsüz ve küresel yapıda oldukları görülmektedir.

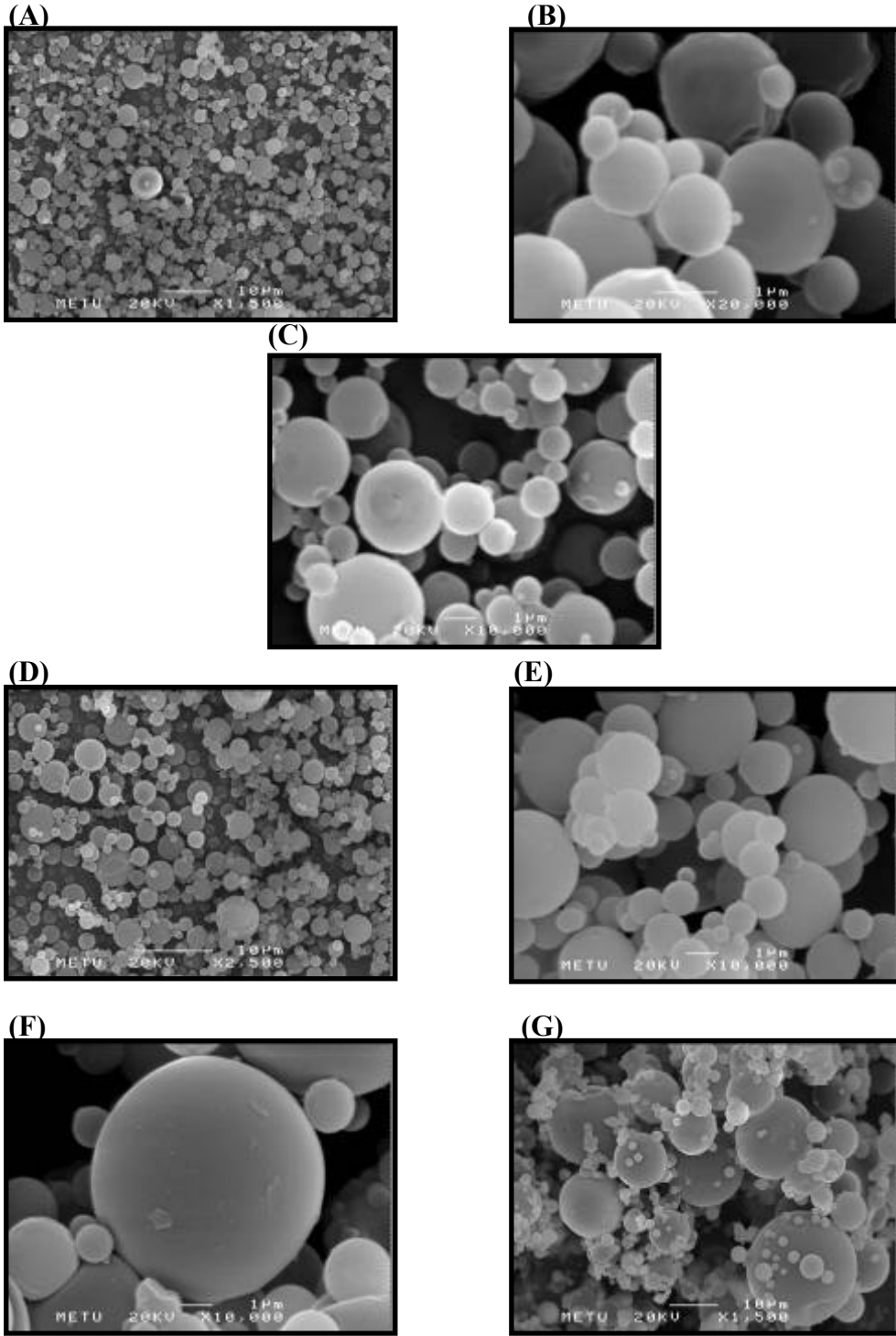
Şekil 4.17-18’de ise prednizolon asetat içeren (% 10 ve % 20) düşük (CL) ve orta (CM) molekül ağırlıklı % 0,5 ve % 1 konsantrasyonlarda kitosan kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının SEM fotoğraflarında benzer şekilde homojen dağılımda, pürüzsüz yüzeye sahip ve küresel yapıda oldukları görülmektedir.



Şekil 4.15. Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan etkin madde içermeyen mikroküre formülasyonlarına ilişkin SEM fotoğrafları
A: % 0,5 (a/h) kitosan konsantrasyonu (CL0,5 formülasyonu)
B: % 1 (a/h) kitosan konsantrasyonu (CL1 formülasyonu)



Şekil 4.16. Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan etkin madde içermeyen mikroküre formülasyonlarına ilişkin SEM fotoğrafları
A: % 0,5 (a/h) kitosan konsantrasyonu (CM0,5 formülasyonu)
B: % 1 (a/h) kitosan konsantrasyonu (CM1 formülasyonu)



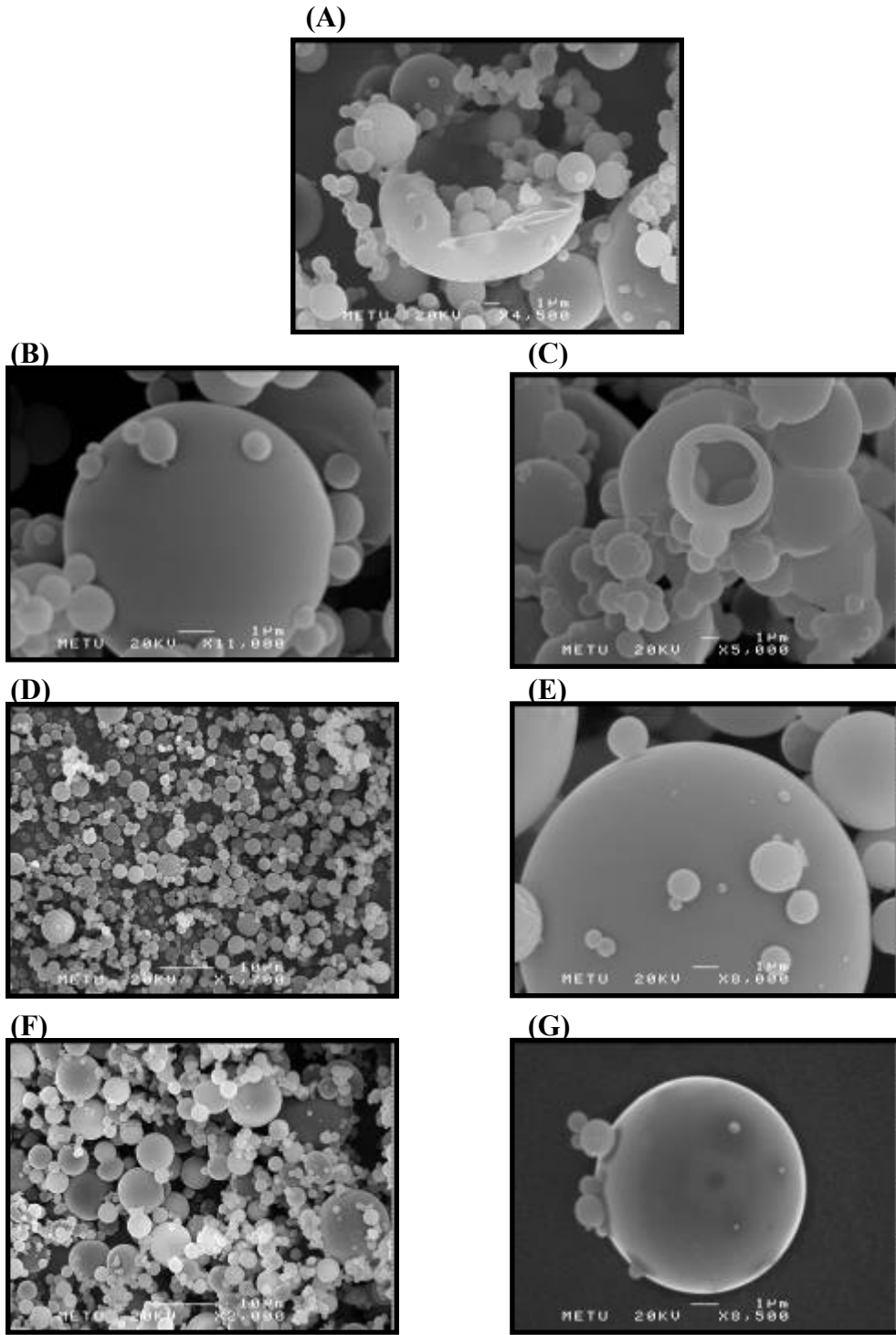
Şekil 4.17. Düşük molekül ağırlıklı kitosan polimeri kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin SEM fotoğrafları

(A) ve (B) % 0,5 (a/h) kitosan ve % 10 prednizolon asetat içeren formülasyon (CL0,5PA10)

(C) % 0,5 (a/h) kitosan ve % 20 prednizolon asetat içeren formülasyon (CL0,5PA20)

(D) ve (E) % 1 (a/h) kitosan ve % 10 prednizolon asetat içeren formülasyon (CL1PA10)

(F) ve (G) % 1 (a/h) kitosan ve % 20 prednizolon asetat içeren formülasyon (CL0,5PA20)



Şekil 4.18. Orta molekül ağırlıklı kitosan polimeri kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin SEM fotoğrafları

- (A) % 0,5 (a/h) kitosan ve % 10 prednizolon asetat içeren formülasyon (CM0,5PA10)
 (B) ve (C) % 0,5 (a/h) kitosan ve % 20 prednizolon asetat içeren formülasyon (CM0,5PA20)
 (D) ve (E) % 1 (a/h) kitosan ve % 10 prednizolon asetat içeren formülasyon (CM1PA10)
 (F) ve (G) % 1 (a/h) kitosan ve % 20 prednizolon asetat içeren formülasyon (CM0,5PA20)

4.5.2. Partikül Büyüklüğü Tayini

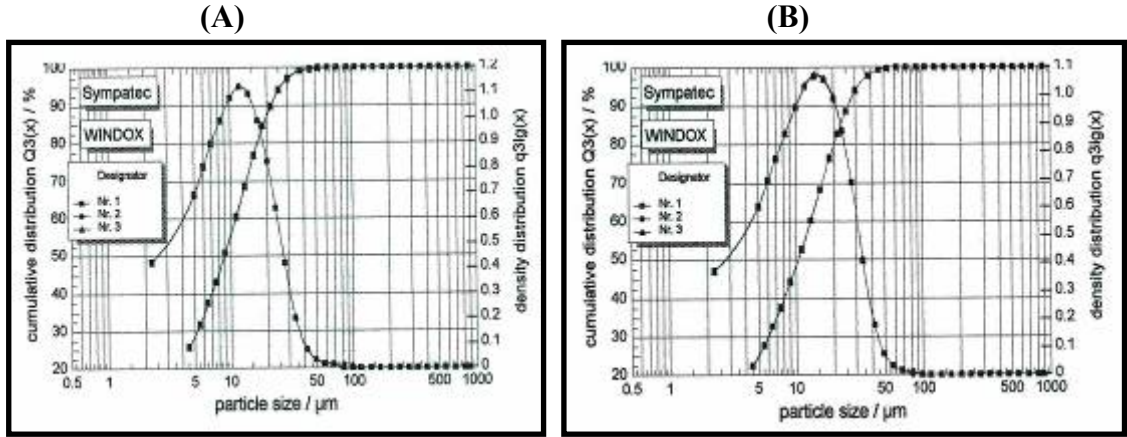
Etkin madde içeren ve içermeyen mikrokürelerin partikül büyüklükleri Bölüm 3.2.5.2’de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Her bir formülasyona ilişkin tayin edilen partikül büyüklükleri Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9. Prednizolon asetat içeren ve içermeyen mikroküre formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları

Formülasyon Kodu*	Partikül Büyüklüğü (μm) Ortalama $\pm$ Standart Sapma (n=3)
CL0,5	9,91 $\pm$ 0,06
CL1	5,98 $\pm$ 0,05
CM0,5	6,68 $\pm$ 0,03
CM1	4,13 $\pm$ 0,01
CL0,5PA10	11,65 $\pm$ 0,03
CL0,5PA20	10,38 $\pm$ 0,04
CL1PA10	9,91 $\pm$ 0,05
CL1PA20	11,42 $\pm$ 0,03
CM0,5PA10	10,60 $\pm$ 0,05
CM0,5PA20	5,10 $\pm$ 0,03
CM1PA10	8,87 $\pm$ 0,03
CM1PA20	10,41 $\pm$ 0,03

* Formülasyon kısaltmalarına ilişkin açılımlar Tablo 3.3’de (Sayfa 53) verilmiştir

Şekil 4.19’da örnek olarak 2^2 faktöriyel tasarım kullanılarak geliştirilen etkin madde içeren ve içermeyen orta molekül ağırlıklı % 1 (a/h) kitosan konsantrasyonu ve/veya % 20 etkin madde içeren optimum formülasyonlara ilişkin partikül büyüklüğü dağılım grafikleri verilmiştir. Etkin madde içeren ve içermeyen bütün mikroküre formülasyonları için partikül büyüklüğü dağılımları; normal (gauss) dağılım göstermiş, mod ve medyan değerleri birbirine yakın bulunmuş, sonuç olarak dağılımlar monomodal çıkmıştır.



Şekil 4.19. Mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılım grafikleri
(A) CM1 ve (B) CM1PA20 (Formülasyon kodları Tablo 3.3’de verilmiştir, Sayfa 53)

4.5.3. Mikrokürelerin Üretim Verimi

Bölüm 3.2.5.3’de anlatıldığı şekilde hesaplanan üretim verimleri sonuçları Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4.10. Prednizolon asetat içeren ve içermeyen mikroküre formülasyonlarına ilişkin üretim verimi sonuçları

Formülasyon Kodu*	Üretim Verimi (%) Ortalama ± Standart Sapma (n=3)
CL0,5	29,6 ± 4,1
CL1	55,0 ± 2,0
CM0,5	27,0 ± 4,5
CM1	41,3 ± 3,7
CL0,5PA10	30,5 ± 2,7
CL0,5PA20	40,2 ± 3,2
CL1PA10	59,2 ± 5,4
CL1PA20	70,6 ± 1,9
CM0,5PA10	21,6 ± 5,4
CM0,5PA20	35,0 ± 2,5
CM1PA10	43,9 ± 1,9
CM1PA20	48 ± 6,7

* Formülasyon kısaltmalarına ilişkin açıklamalar Tablo 3.3’de verilmiştir.

4.5.4. Mikrokürelere Yüklenen Prednizolon Asetat Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

2^2 faktöriyel tasarımıyla geliştirilen mikroküre formülasyonlarına yüklenen prednizolon asetat miktarının belirlenmesi için Bölüm 3.2.5.4’de verilen yöntem kullanılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen etkin madde içerikleri Tablo 4.11’de verilmiştir. Faktöriyel tasarım ile polimer konsantrasyonu ve hedeflenen etkin madde yükleme oranı etkenlerinin, bağımlı değişken olan yüklenen prednizolon asetat miktarı üzerine etkisi incelenmiş ve pozitif yöndeki bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$).

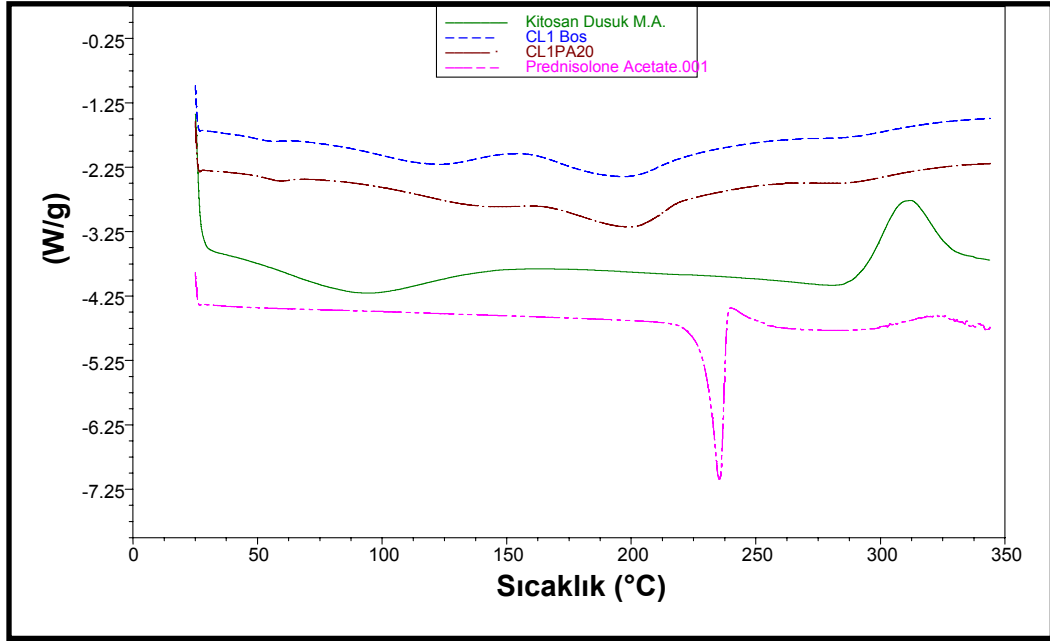
Tablo 4.11. Prednizolon asetat içeren mikroküre formülasyonlarına ilişkin yükleme etkinliği sonuçları

Formülasyon*	Prednizolon Asetat Yükleme Etkinliği (%) Ortalama $\pm$ Standart Sapma (n=3)
CM0,5PA10	5,1 $\pm$ 3,0
CM0,5PA20	30,8 $\pm$ 4,3
CM1PA10	40,0 $\pm$ 3,0
CM1PA20	45,7 $\pm$ 0,3
CL0,5PA10	4,6 $\pm$ 0,5
CL0,5PA20	28,8 $\pm$ 3,4
CL1PA10	44,0 $\pm$ 2,0
CL1PA20	40,4 $\pm$ 1,4

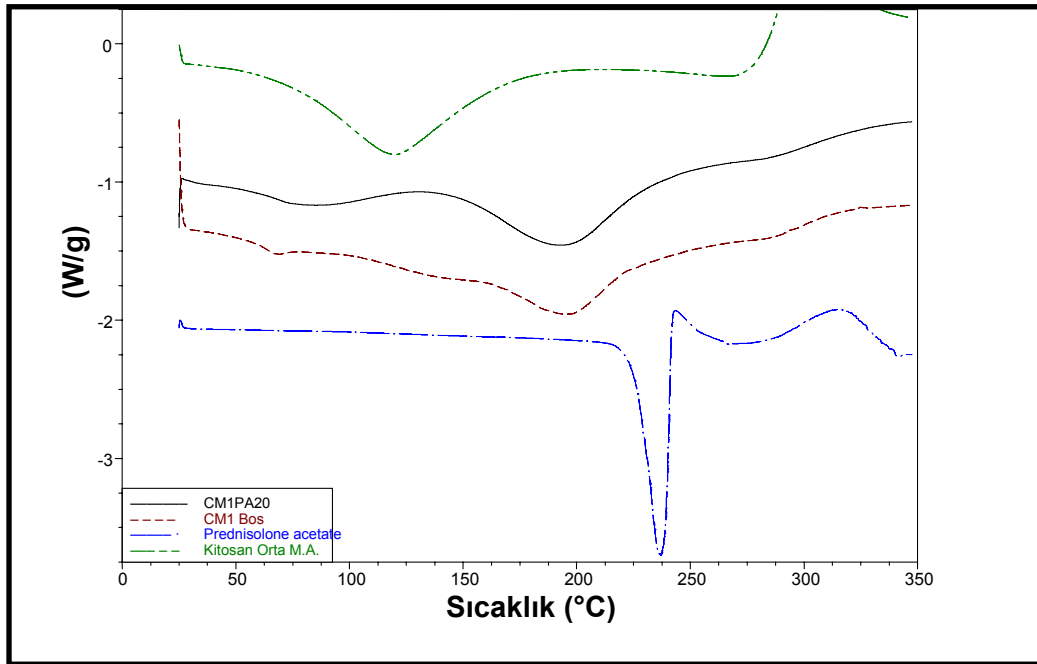
* Formülasyon kısaltmalarına ilişkin açılımlar Tablo 3.3’de (Sayfa 53) verilmiştir

4.5.5. Mikrokürelerin Termodinamik Özelliklerinin Araştırılması

Bölüm 3.2.5.5’de verildiği şekilde gerçekleştirilen, DSC analizlerinin termogramları Şekil 4.20-21’de gösterilmiştir. 2^2 faktöriyel tasarım sonucunda optimize edilen mikroküre formülasyonlarından en uzun süre salım gösteren ve üretim verimleri en yüksek olan iki mikroküre formülasyonuna ilişkin DSC termogramları verilmiştir.



Şekil 4.20. Düşük molekül ağırlıklı % 1 (a/h) kitosan kullanılarak hazırlanan % 20 etkin madde içeren (CL1PA20 formülasyonu) ve içermeyen mikroküre (CL1) formülasyonlarının DSC termogramları



Şekil 4.21. Orta molekül ağırlıklı % 1 (a/h) kitosan kullanılarak hazırlanan % 20 etkin madde içeren (CM1PA20 formülasyonu) ve içermeyen mikroküre (CM1) formülasyonlarının DSC termogramları

Şekil 4.20 ve 21’de verilen DSC termogramlarında, prednizolon asetatın keskin endotermik erime piki 237,09 °C’de gözlenmiştir. Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan polimerlerine ilişkin 100 °C civarında görülen yayvan su buharlaşması piki etkin madde içeren ve içermeyen mikrokürelerde de gözlenmiştir.

4.5.6. İn Vitro Salım Deneyleri

4.5.6.1. Salım Ortamı ve Deneyin Yapılışı

Kitosan mikroküre formülasyonlarından prednizolon asetatın salım çalışmaları Bölüm 3.2.5.6.1’de verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen sekiz mikroküre formülasyonundan prednizolon asetatın salım grafikleri, orta molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan mikroküreler için Şekil 4.22’de, düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılan hazırlanan mikroküreler için Şekil 4.23’de verilmiştir. Orta molekül ağırlıklı kitosan formülasyonlarından prednizolon asetatın salım çalışmalarının sonuçları incelendiğinde düşük polimer konsantrasyonlarına sahip mikrokürelerin salım profillerinde (CM0,5PA10 ve CM0,5PA20) 24 saat sonunda sırasıyla % 63,1 ve % 27,2’lik bir salım gözlenirken, yüksek polimer konsantrasyonuna sahip formülasyonların (CM1PA10 ve CM1PA20) 24 saat sonunda gösterdikleri salım sırasıyla % 50,5 ve % 32,7 bulunmuştur (Şekil 4.22). Salım çalışmaları onbir gün devam ettirilmiş ve en uzun süreli salım CM1PA20 formülasyonundan elde edilmiştir. En kısa süreli salım ise üçüncü gün sonunda düşük polimer ve etkin madde yükleme oranına sahip formülasyonda (CM0,5PA10) gözlenmiştir.

Düşük molekül ağırlıklı kitosan formülasyonlarından prednizolon asetatın salım çalışmalarında ise 24 saat sonunda düşük polimer konsantrasyonlarına sahip mikrokürelerin salım profillerinde (CL0,5PA10 ve CL0,5PA20) sırasıyla % 63,5 ve % 28,3’lik bir salım gözlenirken, yüksek polimer konsantrasyonuna sahip formülasyonlarda (CM1PA10 ve CM1PA20) 24 saat sonunda sırasıyla % 36,6 ve % 33,5’lik salım bulunmuştur (Şekil 4.23). Yüksek polimer ve etkin madde yükleme oranına sahip formülasyondan (CL1PA20) etkin madde salımı onuncu günde

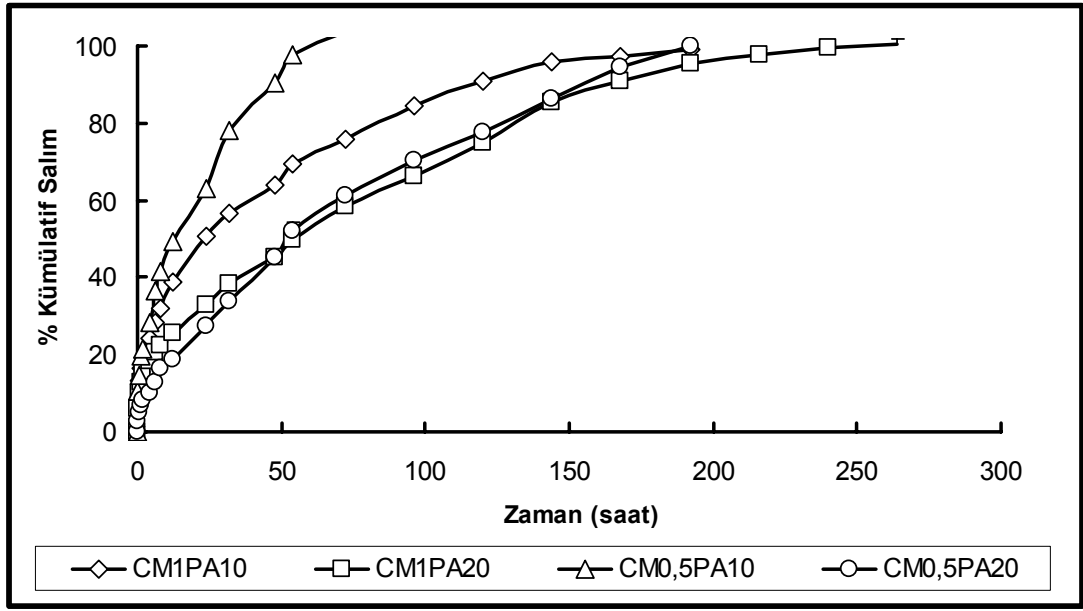
tamamlanırken düşük polimer ve etkin madde yükleme oranına sahip formülasyon (CL0,5PA10) ikinci gün sonunda bütün etkin madde içeriğini salmıştır.

İn vitro salım deneyi sonuçlarında, standart sapma değerlerinin küçük oluşu ($\pm$ % 1-3) grafikte standart sapma çubuklarının görülememesine yol açmaktadır. Görüldüğü gibi mikroküre formülasyonlarının salım profillerine bakıldığında, ilk 24 saat boyunca patlama etkisi tespit edilmiş, 24 saatten sonra kontrollü bir salım elde edilmiştir. Grafiklerden görüleceği üzere formülasyonlarda kullanılan kitosan polimerinin konsantrasyonundaki artış prednizolon asetatın salım süresinde uzamaya yol açmaktadır. Ayrıca orta molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak geliştirilen formülasyonlar düşük molekül ağırlıklı kitosan mikroküre formülasyonlarına göre daha uzun süre prednizolon asetat salımı göstermiştir. Kitosanın molekül ağırlığındaki ve konsantrasyonundaki artış, mikrokürelerden prednizolon asetatın salım süresini uzatmıştır. Mikrokürelerden etkin maddenin salımının hangi kinetik modele göre gerçekleştiğinin tayini için 0.derece, Higuchi ve Hixon-Crowell modelleri uygulanmış ve bütün mikroküre formülasyonları için en büyük R^2 değeri Higuchi kinetiğinden elde edilmiştir. Higuchi kinetiği matriks yapısından salımı öngören bir kinetiktir ve mikrokürelerimizden gerçekleşen etkin madde salımının matriks yapısından salım kinetiğine uyduğu bulunmuştur (Tablo 4.12).

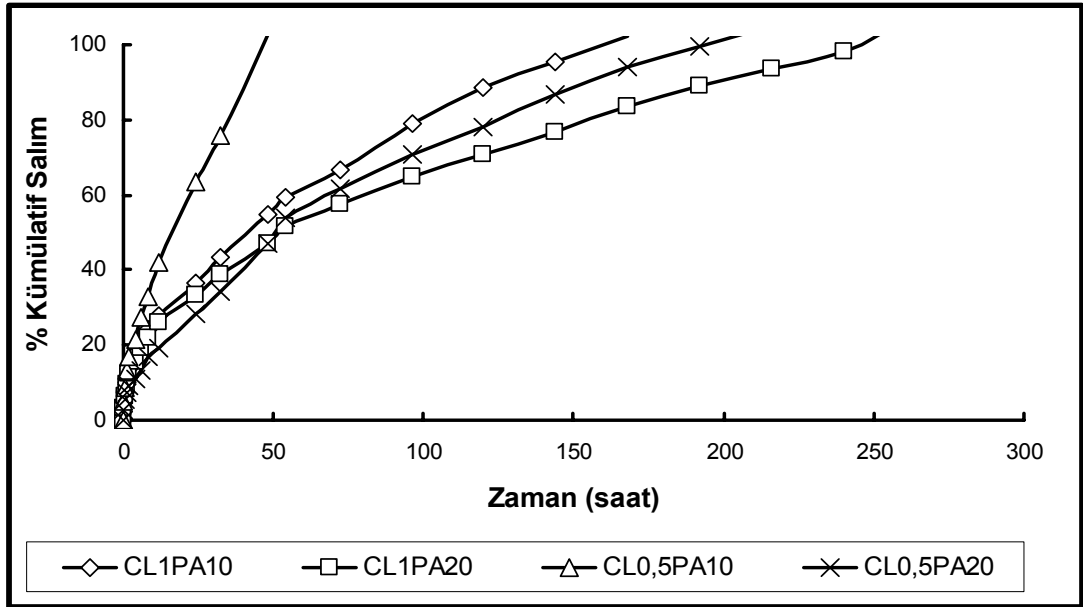
Tablo 4.12. Mikroküre formülasyonlarına ilişkin salım kinetiklerinin değerlendirilmesi

Formülasyon	Uygulanan Kinetik Model											
	Higuchi				0. Derece				Hixon-Crowell			
	m	n	R ²	Toplam Residual	m	n	R ²	Toplam Residual	m	n	R ²	Toplam Residual
CL0,5PA10	14,23	-4,23	0,989	98,19	1,93	12,79	0,978	2010,45	0,07	0	0,927	544,97
CL0,5PA20	7,40	-3,04	0,994	101,99	0,52	12,89	0,951	3927,49	0,02	0,07	0,974	421,60
CL1PA10	7,75	1,57	0,999	31,49	0,57	17,45	0,939	6186,45	0,02	0,13	0,975	1066,03
CL1PA20	6,19	3,43	0,998	31,16	-0,01	4,57	0,937	8362,52	0,01	0,21	0,986	2287,85
CM0,5PA10	11,86	6,56	0,991	109,49	-0,07	4,76	0,989	8470,05	0,05	0,23	0,989	1748,70
CM0,5PA20	7,43	-3,78	0,994	116,65	0,52	12,13	0,949	3489,41	0,02	0,04	0,96	351,72
CM1PA10	7,04	11,61	0,984	357,15	-0,02	4,48	0,979	16584,70	0,02	0,38	0,957	5072,94
CM1PA20	6,27	4,79	0,993	150,71	-0,02	4,78	0,896	10737,14	0,01	0,17	0,995	1698,69

* Formülasyon kısaltmalarına ilişkin açıklamalar Tablo 3.3’de (Sayfa 53) verilmiştir



Şekil 4.22. Orta molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarından prednizolon asetat salımı (n=6)



Şekil 4.23. Düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarından prednizolon asetat salımı (n=6)

4.5.6.2. İn Vitro Salım Deneylerinin Validasyonu

Bölüm 3.2.5.6.2’de verilen in vitro salım deneylerinin validasyon çalışmalarına göre tüm mikroküre formülasyonlarına, her bir örnek alınan zaman noktası için % kümülatif salınan prednizolon asetat miktarları için ortalama VK hesaplanmıştır (Tablo 4.13). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde tüm formülasyonlarda ortalama VK değerinin % 5’den küçük olduğu görülmüştür.

Tablo 4.13. Kitosan mikroküre formülasyonlarından in vitro salım deneylerinin validasyonuna ilişkin bulgular

Formülasyon*	Ortalama Varyasyon Katsayısı
CL0,5PA10	1,42
CL0,5PA20	1,34
CL1PA10	2,05
CL1PA20	1,45
CM0,5PA10	1,53
CM0,5PA20	2,30
CM1PA10	2,79
CM1PA20	2,58

*Formülasyon kısaltmalarına ilişkin açıklamalar Tablo 3.3’de (Sayfa 53) verilmiştir

4.6. Biyoparçalanır PLGA Stentlerinin Hazırlanması

4.6.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Biyoparçalanır stent üretim materyali olarak, parçalanma süreleri, sağladıkları mekanik özellikler ve uzun süreli ilaç salım profili sağlamaları sebebiyle PLGA polimerinin PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) türleri kullanılmıştır.

Polimer filminden hareketle biyoparçalanır stent hazırlanması yönteminde, kullanılacak olan polimer çözeltisinin konsantrasyonunu belirlemek için ön formülasyon çalışmaları sırasında hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltiler arasından % 25 (a/h) oranı uygun konsantrasyon olarak seçilmiştir. Ayrıca, filmlerin

mekanik dayanıklılıklarını azaltmadan kırılganlıklarının önüne geçmek için plastizer kullanımına karar verilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalar içinden uygun plastizer olarak PEG 4000 seçilmiştir. Farklı konsanrasyonlarda plastizer polimer çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanan formülasyonlar içinden, en iyi fiziksel özellikleri sağlayan ve % 0,5 (a/h) konsantrasyonunda PEG 4000 içeren formülasyon seçilmiştir.

Polimer filmlerinden hareketle farklı şekillerde biyoparçalanır stent hazırlanabilmektedir. Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, bu şekiller arasından helikal yapıdaki biyoparçalanır stentler amacımıza en uygun stent yapısı olarak seçilmiştir. Gösterdikleri mekanik dayanıklılık ve üretimlerindeki kolaylık bu şeklin seçilmesinde rol oynamıştır.

Prednizolon asetat ve prednizolon asetat içeren mikrokürelerin diklorometan içerisinde çözülmüş olan PLGA çözeltilerine karıştırılması sonucunda fiziksel bir geçimsizlik araştırılmıştır. Etkin madde ya da etkin madde içeren mikrokürelerin polimer çözeltisi içerisinde kolayca disperse olabildikleri ve herhangi bir geçimsizlik ya da istenmeyen duruma yol açmadıkları gözlenmiştir.

4.6.2. Stentlerin Hazırlanmasında Kullanılacak Olan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) Polimer Filmlerinin Hazırlanması

Bölüm 3.2.6.2’de verildiği gibi PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) filmleri hazırlanırken kullanılan çözelti dökme yönteminin ile 0,3x3 cm’lik polimer filmi şeritlerinin eldesi için kolay uygulanabilen uygun bir yöntem olduğu bulunmuştur. Bu yöntemde polimer çözeltisi içinden mikropipet yardımı ile alınan miktar lam üzerine kaplanan alüminyum folyonun yüzeyine kolayca yayılmıştır ve elde edilen polimer filmi tabakasından istenen kalınlıkta şeritler kesilebilmesinde bir sorun yaşanmamış, neşter yardımı ile hassasiyetle kesim yapılarak polimer şeritleri oluşturulmuştur.

4.6.3. Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması

Bölüm 3.2.6.3’de verilen üretim yöntemine göre, biyoparçalanır stentlerin hazırlanması sırasında kullanılan işlem basamakları sorunsuz olarak uygulanmıştır. Polimer filmleri pirinç çubuklar üzerine sarıldıklarında istenen şekli almışlar ve tam bir kuruma sağlanmadan verilen bu şekillerini kaybetmeden pirinç çubuklar üzerinde tutunmuşlardır.

Etüvde bekletilerek organik çözücünün tamamen uzaklaşması sağlanmış ve biyoparçalanır stentlerin pirinç çubuklar üzerinden ayrılmadan verilen helikal şekillerini korudukları gözlenmiştir. Oluşan yapıların ön formülasyon çalışmaları ile geliştirilen formülasyon parametreleri sayesinde esneyebildikleri fakat kırılmadıkları gözlenmiştir.

4.6.4. Etkin Madde ve Mikroküre İçeren Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması

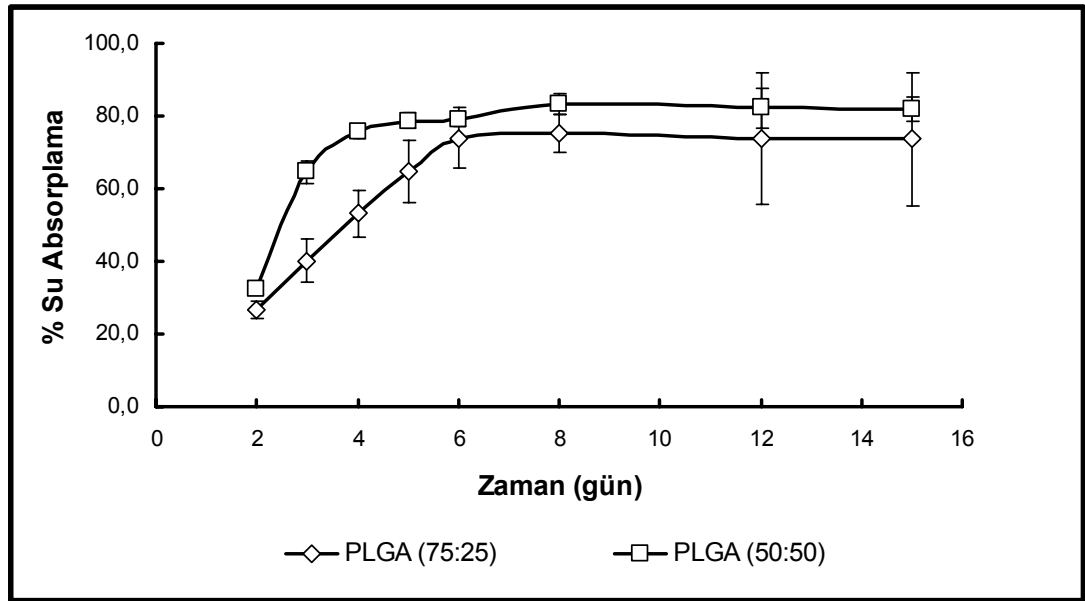
Etkin madde ya da etkin madde yüklü kitosan mikroküreleri içeren stentlerin hazırlanması için kullanılan yöntem Bölüm 3.2.6.4’de verilmiştir. Gerekli miktarlarda (1 mg) tartılan etkin maddenin polimer çözeltisine eklenmesini takiben manyetik karıştırıcıda karıştırma sonucunda etkin maddenin tekdüze bir şekilde polimer çözeltisi içinde kolayca disperse olduğu gözlenmiştir.

Etkin madde içeren kitosan mikrokürelerinin yapıya eklenmesi sonucunda benzer olarak Bölüm 3.2.6.3’de verilen üretim işlemleri üzerinde olumsuz bir gelişme görülmemiştir. Biyoparçalanır stent formülasyonlarına eklenecek mikroküre formülasyonu olarak CM1PA20 (orta molekül ağırlıklı kitosan % 1 (a/h), prednizolon asetat % 20 (a/h)) kodlu formülasyon seçilmiştir.

4.7. Hazırlanan Biyoparçalanır Stentlerin Karakterizasyonu

4.7.1. Polimer Filmlerinin Şişme ve Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi

PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimer filmlerinin su absorplama özelliklerinin incelenmesi için bu polimerler kullanılarak hazırlanan film şeritleri in vitro salım ortamı olan % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS (pH 7,4) çözeltisi içinde inkübe edilmişlerdir. Bölüm 3.2.7.1’de anlatıldığı şekilde belirli zaman aralıklarında ortamdan alınarak tartıldığında başlangıçtaki ağırlıkları esas alınarak saptanan ağırlık değişimleri % olarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.24’de polimer filmlerinin su absorplama grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.24. Hazırlanan polimer filmlerinin su absorplama profilleri (n=6)

Şekil 4.24’de de görüldüğü üzere başlangıçta (2. gün) PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) filmleri için sırasıyla % su absorplama değerleri % 26,7 ve % 32,2 olarak bulunmuştur. Bu değerler PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) için altıncı günün sonunda dengeye ulaşmıştır. Onbeşinci günün sonunda PLGA (50:50) filmlerinin su

absorplama yüzdesi %81,9, PLGA (75:25) polimeri ile hazırlanan filmlerin su absorplama yüzdesi ise %73,6 olarak bulunmuştur. PLGA (50:50) polimerinin hidrofilik yapısı nedeniyle su absorplama değerleri PLGA (75:25) polimerine göre her zaman noktası için daha yüksek bulunmuştur.

4.7.2. Hazırlanan Polimer Filmlerinin ve Stentlerin Kalınlık Kontrolü

Bölüm 3.2.7.2’de verildiği şekilde ölçülen PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerlerinden üretilen filmlerin kalınlıkları ve bu filmlerden hazırlanan stentlerin boyutları Tablo 4.13’de verilmiştir (Bkz. Şekil 4.30).

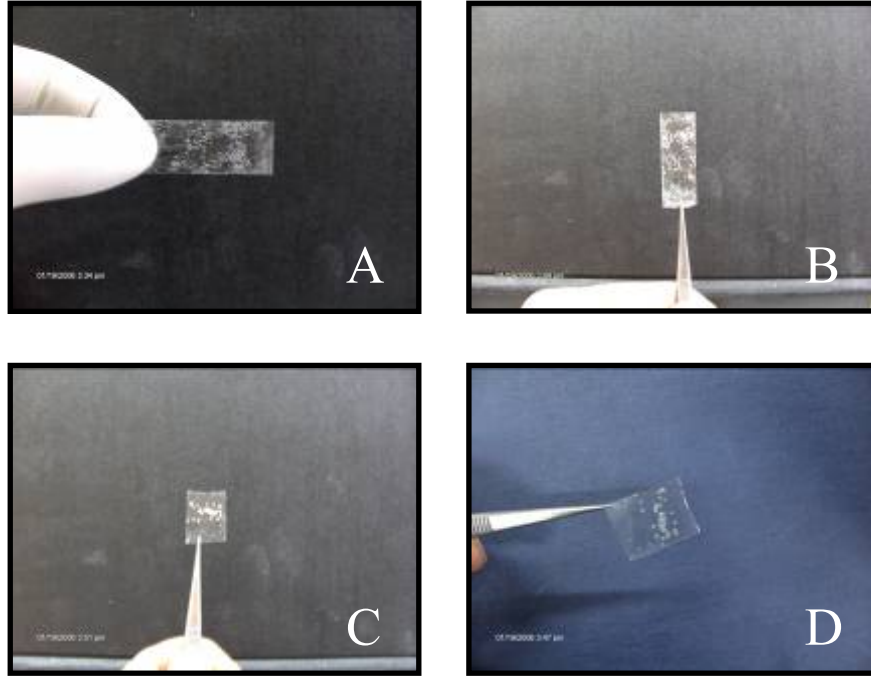
Tablo 4.14. Polimer filmlerinin ve hazırlanan stentlerin kalınlıkları (n=12)

Polimer	Kalınlık (μm) (Ortalama $\pm$ Standart sapma)	Uzunluk (cm)	İç çapı (mm)
PLGA (75:25)	$136 \pm 5 \mu\text{m}$	1,5	3
PLGA (50:50)	$109 \pm 8 \mu\text{m}$	1,5	3

4.7.3. Hazırlanan Stent Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

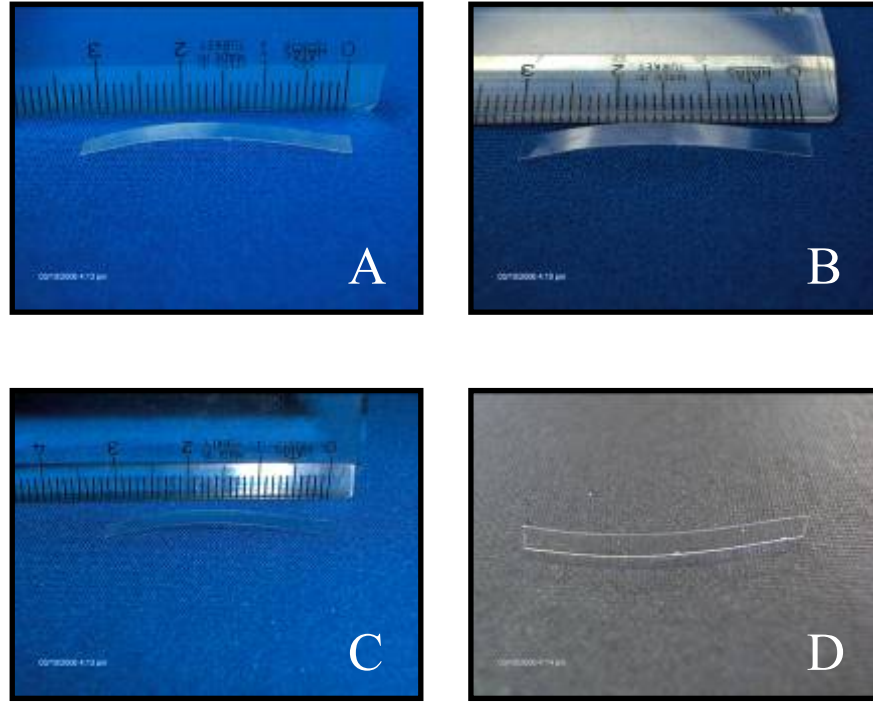
Biyoparçalanır stent formülasyonlarının yüzey özelliklerinin incelenmesi için SEM ile görüntüleme tekniği kullanılırken, yapıların genel şekillerinin ve yüzey görüntülerinin değerlendirilmesinde dijital fotoğraf makinası ile çekilen resimlerden yararlanılmıştır. Helikal stent yapılarının hazırlanması amacıyla üretilen polimer filmleri farklı ortamlarda tutularak çözücü içerikleri uzaklaştırılmış ve filmler kurutulmuşlardır. Bölüm 3.2.6.1’de verilen ön formülasyon çalışmalarında anlatıldığı şekilde hazırlanan polimer filmlerinden, oda sıcaklığında diklorometanın uzaklaştırılmasıyla hazırlanan filmlerin fotoğrafları Şekil 4.25’de verilmiştir.

Fotoğraflardan da görüleceği üzere oda sıcaklığında bekletilerek diklorometanın uzaklaştırılması sırasında polimer filminde çok sayıda hava kabarcığı oluşmakta ve bu durum filmin yapısında bozulmalara yol açmaktadır. Hava kabarcıkları üretilen filmlere şekil verilmesini engellemiş ve kolay kırılabilen yapıların oluşmasına yol açmıştır.



Şekil 4.25. Oda sıcaklığında kurutularak elde edilen filmler.
A ve B: PLGA (75:25), C ve D: PLGA (50:50) polimer filmi
(Dijital kamera ile görüntülenmiştir)

Oda sıcaklığında bekletme sonucu elde edilen filmlerdeki hava kabarcıkları oluşumundan korunmak için filmler buzdolabında (+4 °C) bekletilmiş ve diklorometanın kontrollü bir şekilde uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ön formülasyon çalışmaları ile optimize edilen polimer filmi ve stent hazırlama yöntemine göre diklorometanın polimer yapısından uzaklaştırılması sonucu hazırlanan filmlerin şekilleri ise Şekil 4.26'da görülmektedir. Pürüzsüz yapıları ve hava kabarcığı içermemesi kolaylıkla şekillendirilebilmelerini sağlarken, filmler esnekliklerini de korumuşlardır. Film şeritleri 3 cm uzunlukta, 0,3 cm genişlikte hazırlanmıştır.



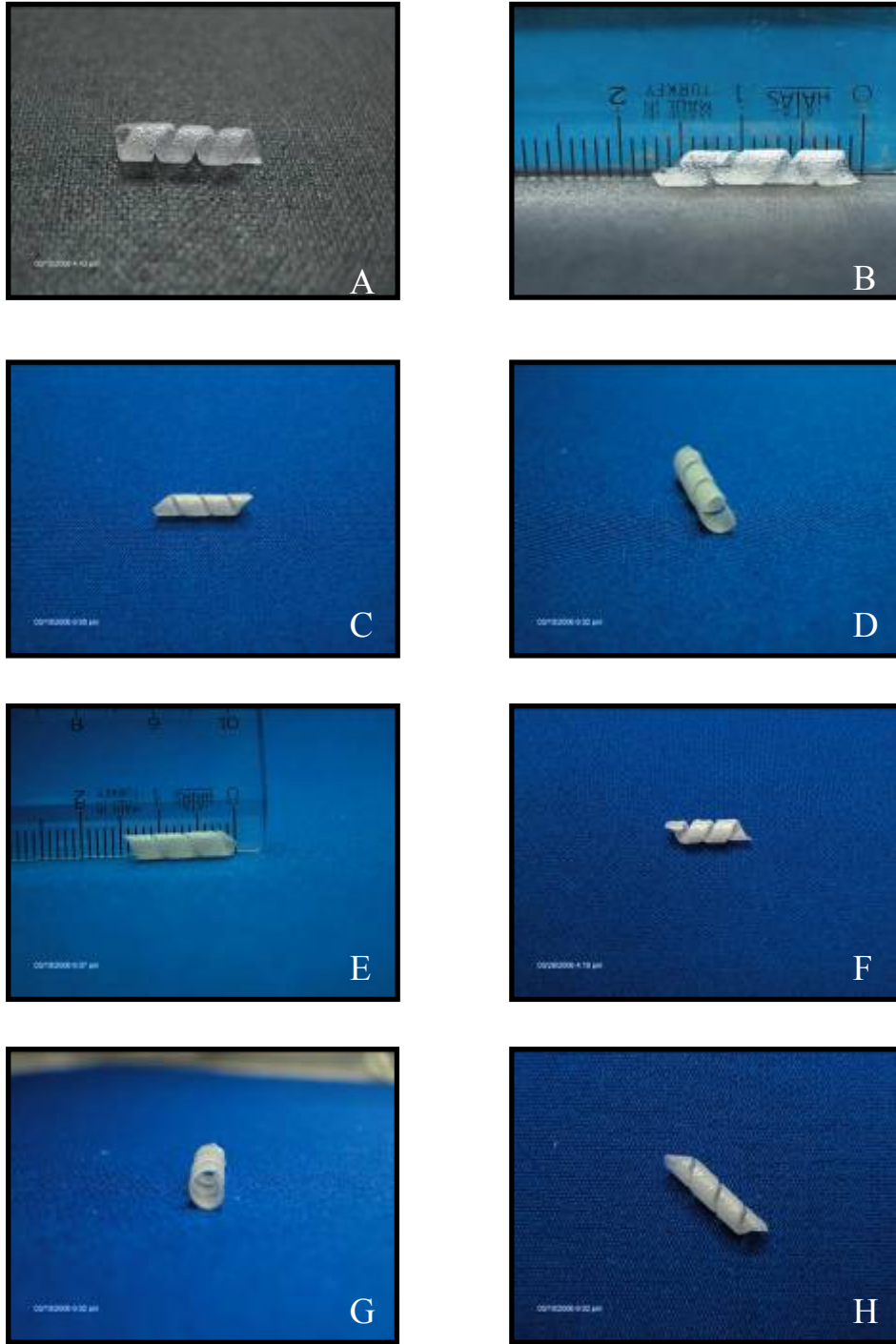
Şekil 4.26. Buzdolabında bekletmeyi takiben etüvde kurutulan polimer filmlerinin görüntüleri.

A ve B: PLGA (75:25) filmleri,

C ve D: PLGA (50:50) filmleri,

(Dijital kamera ile görüntülenmiştir)

Şekil 4.27’de PLGA (75:25) polimeriyle hazırlanan biyoparçalanır stentlerin, Şekil 4.28’de ise PLGA (50:50) polimeriyle hazırlanan stentlerin dijital fotoğraf makinesi ile çekilen fotoğrafları görülmektedir. Genel şekillerine bakıldığında, stentlerin düzgün helikal yapı gösterdikleri gözlenmiştir. Etkin madde içermeyen stentler şeffaf yapıdadırlar. Etkin madde ve mikrokürelerin polimer çözeltileri içerisinde disperse edilmesi ile opak ve beyaz renkli polimer filmleri ve stentler hazırlanmıştır.

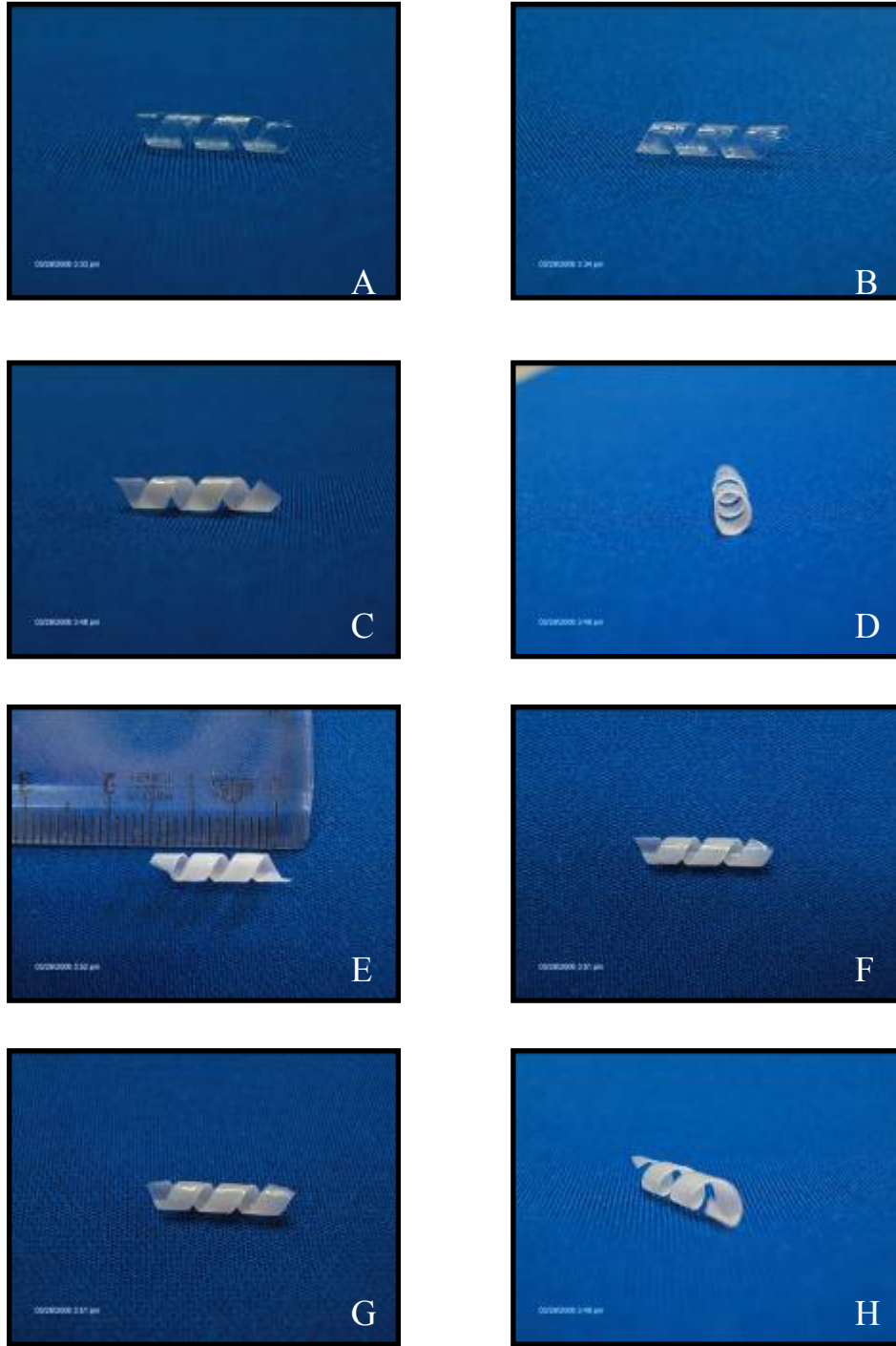


Şekil 4.27. PLGA (75:25) polimeri ile hazırlanan biyoparçalanır stentlerin görüntüleri.

A ve B: Etkin madde içermeyen stentler.

C, D ve E: Etkin madde (Prednizolon asetat) içeren stentler

F, G ve H: Etkin madde yüklü kitosan mikroküre içeren stentler



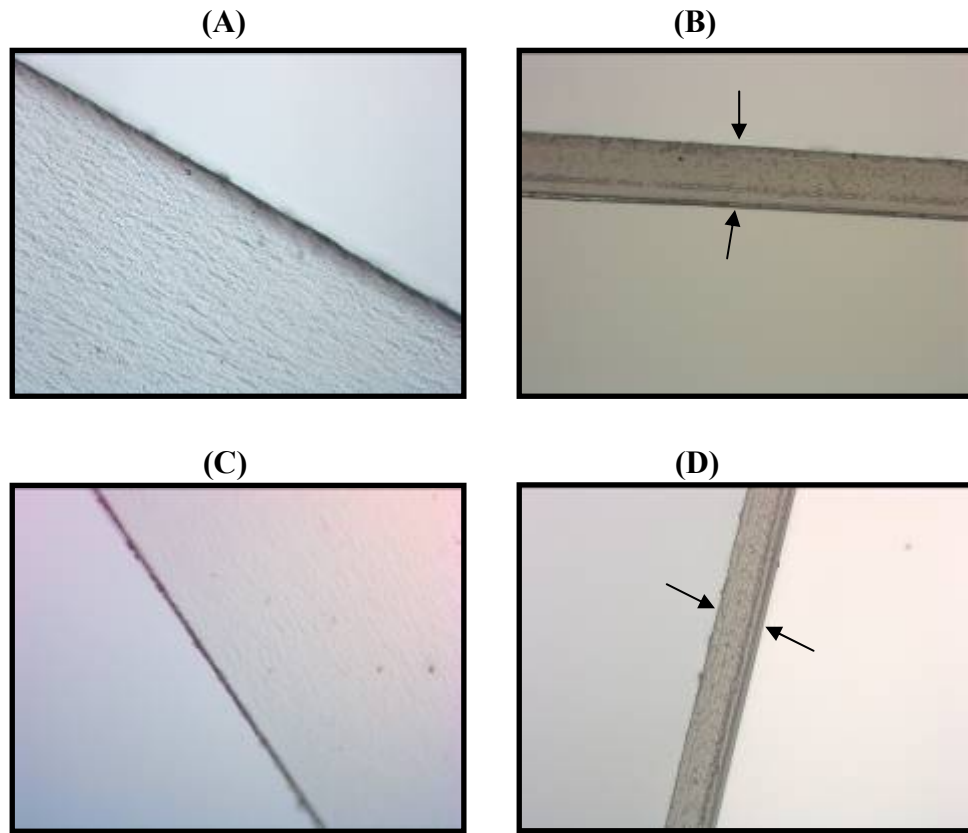
Şekil 4.28. PLGA (50:50) polimeri ile hazırlanan biyoparçalanır stentlerin görüntüleri.

A ve B: Etkin madde içermeyen stentler.

C, D ve E: Etkin madde (Prednizolon asetat) içeren stentler

F, G ve H: Etkin madde yüklü kitosan mikroküre içeren stentler

Polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan filmlerin ve stentlerin kesit fotoğrafları ile yüzey fotoğrafları, SEM analizi öncesi ön değerlendirme amacıyla Leica DFC 320 bilgisayar donanımına bağlı mikroskop sisteminde çekilmiştir. Şekil 4.29'dan görüleceği üzere etkin madde içermeyen filmlerin, yüzeyi düzgün ve kesit alınan bölgeleri pürüzsüzdür. Stentlerin kesit fotoğraflarına bakıldığında da pürüzsüz ve düzgün yüzey özellikleri gözlenmiştir. Etkin madde ya da etkin madde yüklü mikrokürelerin stent yapısına girmesi ile gerçekleşen değişiklikleri görüntülemek için SEM analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.30-33).

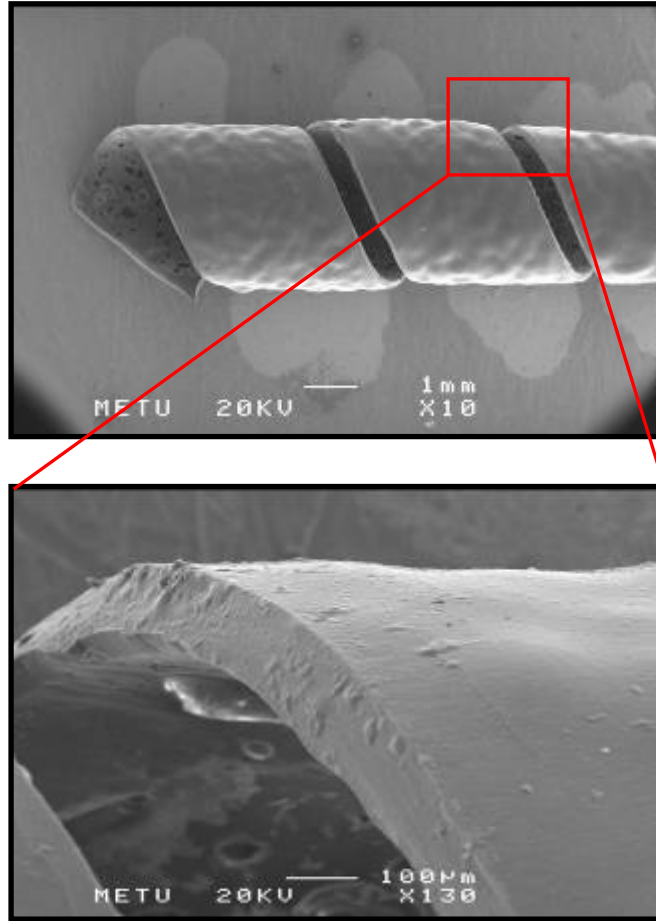


Şekil 4.29. Biyoparçalanır polimerlerle üretilen stentlerin yüzey fotoğrafları

A-B: PLGA (75:25) kullanılarak üretilen stentler

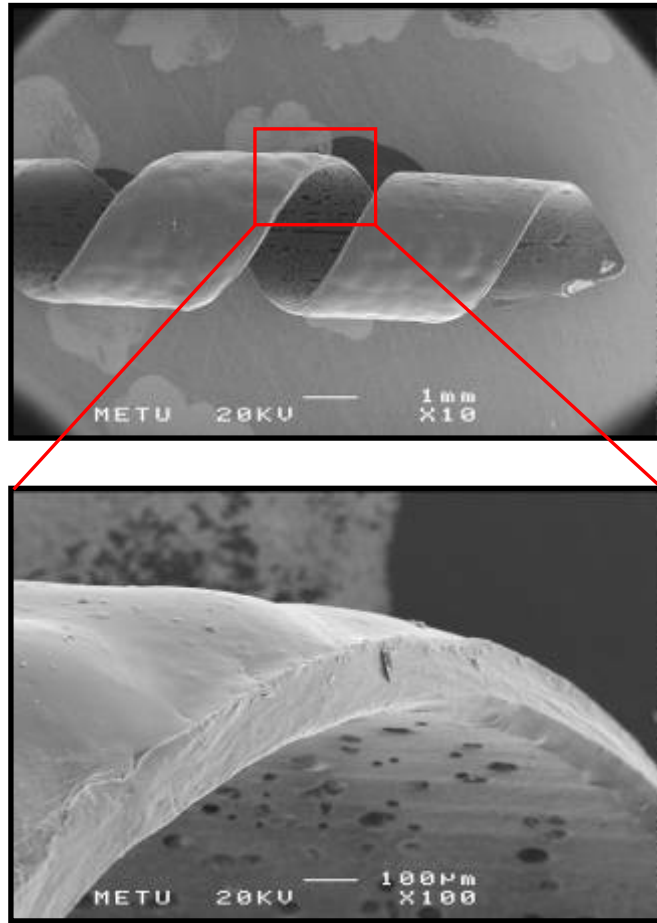
C-D: PLGA (50:50) kullanılarak üretilen stentler

Biyoparçalanır stentlerin yüzey özelliklerinin ayrıntılı olarak incelenmesi için ise SEM ile görüntüleme yapılmıştır. Şekil 4.30'da PLGA (75:25) polimer kullanılarak hazırlanan prednizolon asetat içeren stentlerin SEM fotoğrafları yer almaktadır. Helikal yapının kıvrım bölgelerinden alınan kesit fotoğraflarında etkin maddenin polimer matrisi içinde homojen olarak dağıldığı izlenimi vardır. Yüzey özellikleri incelendiğinde ise pürüzsüz bir yüzey gösterdiği gözlenmiştir. Polimer filmi yüzeyinde herhangi bir çatlama ya da kırılma görülmemektedir. Stentin kenarları düzgün ve pürüzsüzdür. Ön formülasyon çalışmaları ile optimize edilen üretim işlemi, istenen şekil ve yüzey özelliklerinde biyoparçalanır stentlerin hazırlanmasını sağlamıştır.



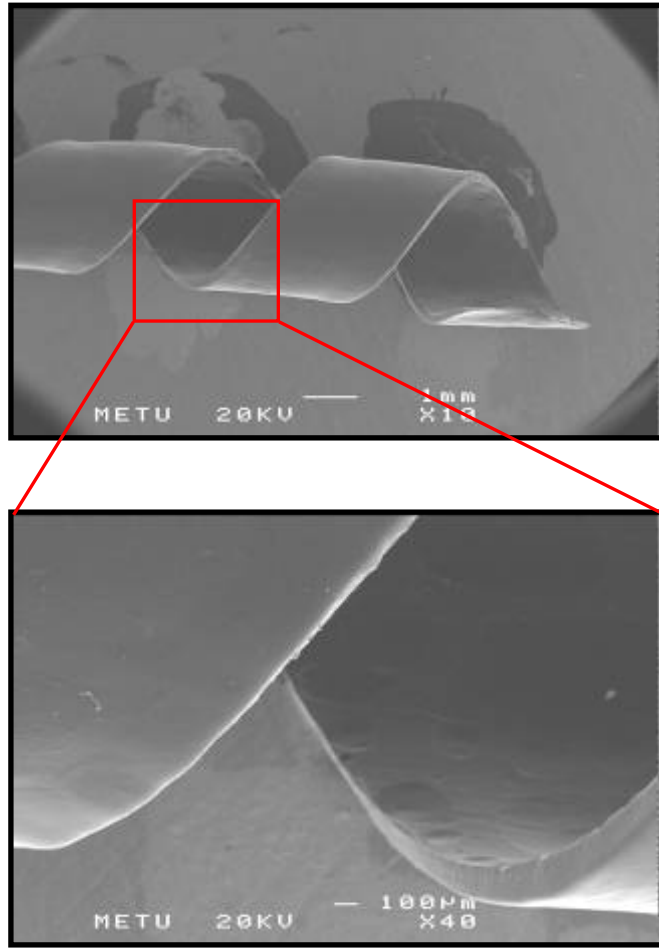
Şekil 4.30. Prednizolon asetat içeren PLGA (75:25) polimeri kullanılarak üretilen biyoparçalanır stentin SEM fotoğrafları

Şekil 4.31’de ise prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren PLGA (75:25) polimeri ile üretilen biyoparçalanır stentlere ilişkin SEM fotoğrafları yer almaktadır. Görüldüğü üzere, mikrokürelerin polimer içerisinde disperse edilmeleri yüzey özelliklerinde gözlenen bir değişikliğe yol açmamıştır. Kesit ve yüzey fotoğraflarında stentlerin yüzeyinde kalmış veya adsorplanmış mikroküre yapıları izlenmemiş ve mikrokürelerin polimer yapısı içinde dağılmış olduğu görülmüştür.



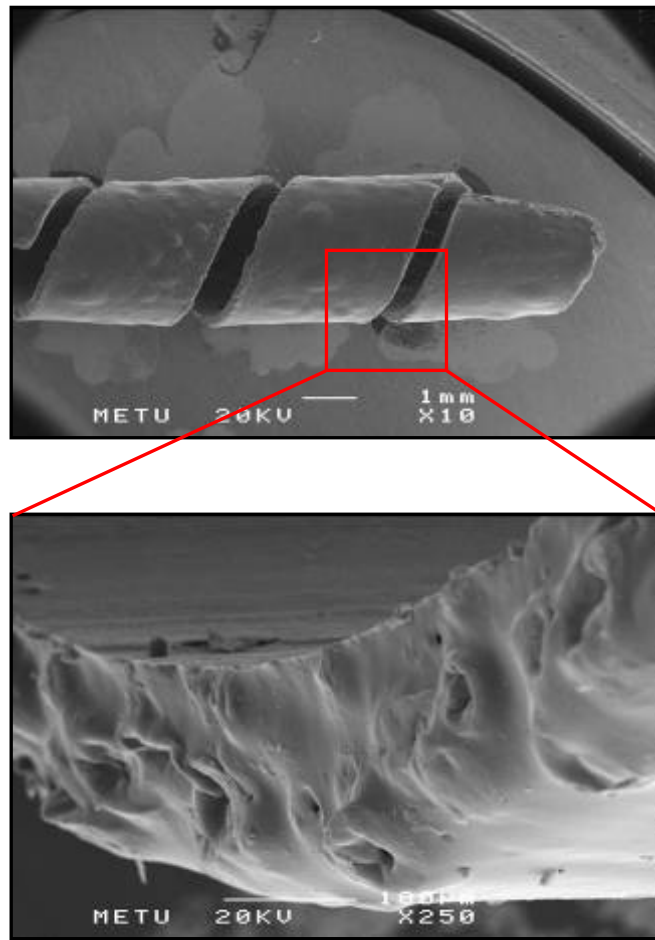
Şekil 4.31. Prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren PLGA (75:25) polimeri kullanılarak üretilen biyoparçalanır stentin SEM fotoğrafları

Prednizolon asetat içeren PLGA (50:50) polimeri ile hazırlanan biyoparçalanır stentlerin SEM fotoğrafları Şekil 4.32’de verilmiştir. Stentlerin yüzeylerinde etkin madde lokalizasyonu görülmemektedir. Ayrıca stentlerin kenarları pürüzsüz ve düzgün yapıdadır. PLGA (75:25) kullanılarak üretilen stentlere benzer olarak, kesit fotoğraflarına bakıldığında etkin maddenin polimer matriksi içinde homojen dağıldığı izlenimini edinmek mümkündür. Polimer yüzeyi ise pürüzsüzdür. Ayrıca kesit fotoğrafları polimer kalınlığının yaklaşık 100 µm civarında olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.32. Prednizolon asetat içeren PLGA (50:50) polimeri kullanılarak üretilen biyoparçalanır stentin SEM fotoğrafları

PLGA (50:50) polimeri içerisinde prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri disperse edilerek hazırlanan biyoparçalanır stentlere ilişkin SEM fotoğrafları ise Şekil 4.33’de verilmektedir. Stentlerin yüzeyinde mikrokürelerin bulunmadığı ve mikrokürelerin de etkin madde gibi polimer matriksi içinde dağıldığı gözlenmektedir. Kesit fotoğraflarına ve stentlerin kenarlarına bakıldığında ise PLGA (75:25) stentleri ve etkin madde içeren PLGA (50:50) stentlerine kıyasla daha pürüzlü bir yapı dikkati çekmektedir. Ancak, stent yüzeyinde mikroküre içeriğine bağlı olarak bariz bir kırılma, çatlama ya da dalgalanma bulunmamaktadır.

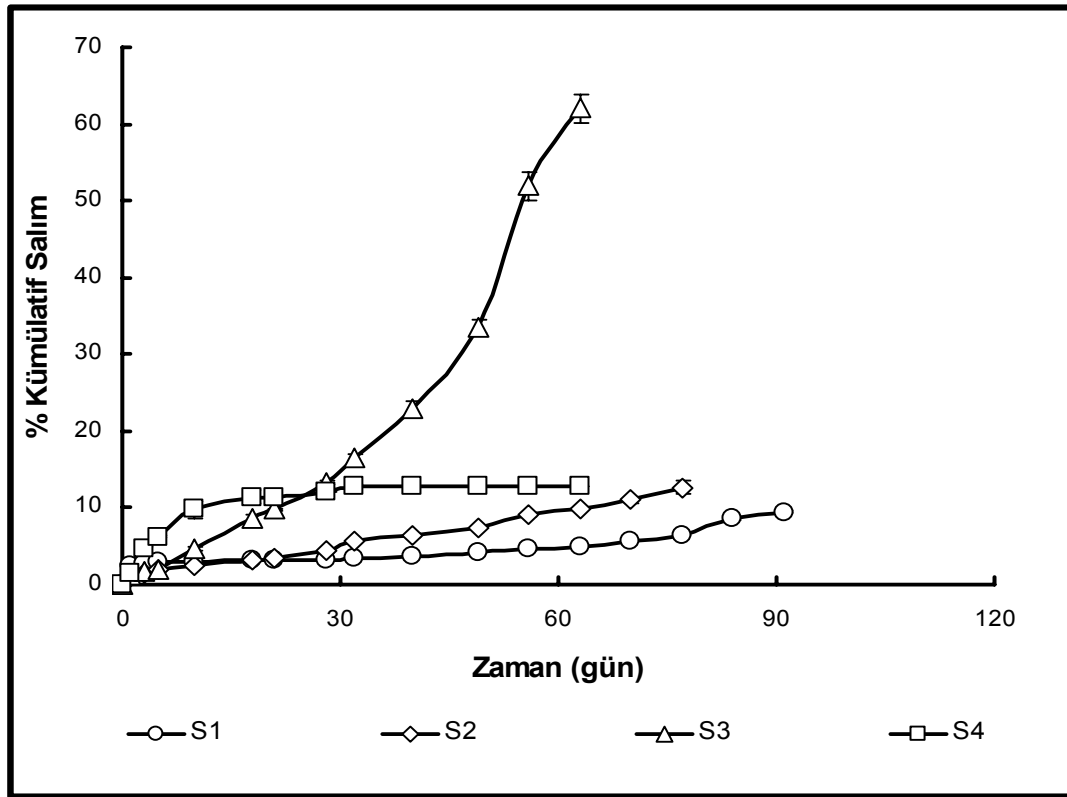


Şekil 4.33. Prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren PLGA (50:50) polimeri kullanılarak üretilen biyoparçalanır stentin SEM fotoğrafları

4.7.4. Biyoparçalanır Stentlerden Prednizolon Asetatın İn Vitro Salım Çalışması

Bölüm 3.2.7.4’de verilen ve mikrokürelerden etkin maddenin salımında da kullanılan yöntemle biyoparçalanır stentlerden etkin maddenin salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

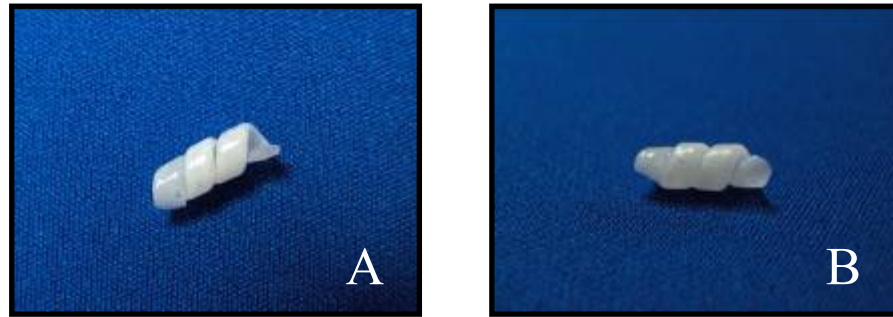
Geliştirilen biyoparçalanır stentlerden zamana karşı % kümülatif salınan etkin madde sonuçlarını gösteren grafikler Şekil 4.34’de verilmiştir. İn vitro salım profillerinin yer aldığı grafikte, standart sapma değerlerinin düşük olması bütün noktalarda standart sapma çubuklarının görülebilmemesine olanak vermemiştir. Grafiğe bakıldığında ikinci ayın sonunda (63. gün) prednizolon asetat içeren PLGA (50:50) (S3 kodlu formülasyon) stentlerinden salım miktarı % 62, prednizolon asetat yüklü mikroküreler içeren PLGA (50:50) stentlerinden (S4 kodlu formülasyon) aynı sürenin sonunda elde edilen salım miktarı % 12,9 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.34. Prednizolon asetat yüklü biyoparçalanır stent formülasyonlarından salım profilleri (n=6, $\bar{X} \pm SS$)

PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) kullanılarak hazırlanan ve prednizolon asetat içeren biyoparçalanır stentlerden etkin madde salımları karşılaştırıldığında ikinci ayın sonunda (63. gün) elde edilen % kümülatif salınan prednizolon asetat miktarları PLGA (75:25) (S1 kodlu formülasyon) için % 5,02, PLGA (50:50) stentleri (S3 kodlu formülasyon) için % 62 olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). PLGA (50:50) polimerinin hidrofilik yapısı hızla su absorplamasına ve parçalanmasına yol açarak etkin madde salımını hızlandırmıştır. Benzer şekilde PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerleri içinde prednizolon asetat yüklü kitosan mikrokürelerinin disperse edilmesiyle hazırlanan biyoparçalanır stentlerden salım incelendiğinde ikinci ay sonunda (63. gün) etkin madde salımının PLGA (50:50) ile hazırlanan stentlerde (S4 kodlu formülasyon) % 12,9, PLGA (75:25) ile hazırlanan stentlerde (S2 kodlu formülasyon) ise % 9,9 olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

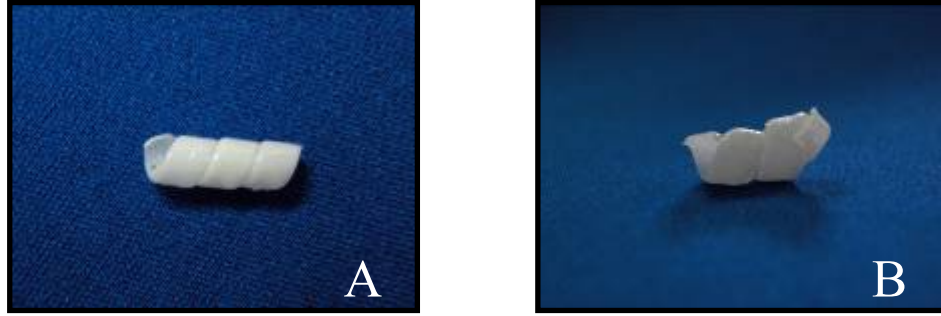
İn vitro salım çalışmalarında farklı günlerde, salım ortamındaki biyoparçalanır stentlerin fotoğrafları Şekil 4.35’de verilmiştir. Salım ortamına bırakılmalarıyla birlikte polimer içeriklerine bağlı olarak farklı oranlarda şişmeye başlayan stent yapılarının boylarında bir değişiklik gözlenmemiş, su absorplama sonucunda oluşan şişmenin stentlerin iç çapını değiştirmeden dış çaplarında artışa yol açtığı gözlenmiştir.



Şekil 4.35. İn vitro salım ortamında 10 gün sonunda prednizolon asetat içeren stentler

A: PLGA (75:25) (S1) stenti, B: PLGA (50:50) (S3) stenti

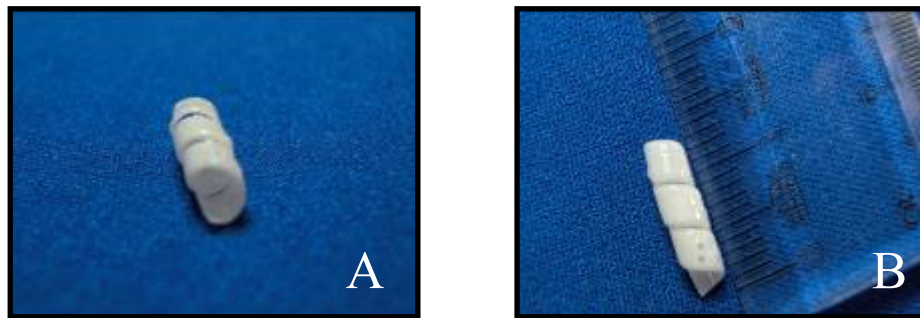
İn vitro salım ortamında kırkinci günün sonunda etkin madde içeren PLGA (50:50) stent yapısında meydana gelen değişiklikler ise Şekil 4.36'da verilmiştir. Prednizolon asetat içeren PLGA (75:25) stentlerinin yapısında, polimerin hidrofobik özelliğine bağlı olarak bir deformasyon gözlenmezken, PLGA (50:50) stentlerinde şekilsel bozulmaların başladığı farkedilmiştir.



Şekil 4.36. İn vitro salım ortamında 40 gün sonunda prednizolon asetat içeren stentler

A: PLGA (75:25) (S1) stenti, B: PLGA (50:50) (S3) stenti

İçeriğinde sadece prednizolon asetat bulunan stentlere (S1 ve S3) benzer şekilde, polimer çözeltisinde mikrokürelerin disperse edilmesi ile hazırlanan biyoparçalanır stentlerin (S2 ve S4) yapılarını uzun süre korudukları gözlenmiştir (Şekil 4.37). Mikrokürelerin stent yapılarına girmesi fiziksel olarak dayanıklılıklarını artırmış ve şekilsel yapılarının korunmasını sağlamıştır.



Şekil 4.37. İn vitro salım ortamında 40 gün sonunda prednizolon asetat yüklü mikroküre içeren stentler

A: PLGA (75:25) stentleri (S2), B: PLGA (50:50) stentleri

Bölüm 3.2.7.4’de verilen in vitro salım deneylerinin validasyon çalışmalarına göre tüm stent formülasyonlarına (S1-S4), her bir örnek alınan zaman noktası için % kümülatif salınan prednizolon asetat miktarları için ortalama VK hesaplanmıştır (Tablo 4.15). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde tüm formülasyonlarda ortalama VK değerinin % 5’den küçük olduğu görülmüştür.

Tablo 4.15. Biyoparçalanır stent formülasyonlarından in vitro salım deneylerinin validasyonuna ilişkin bulgular

Formülasyon*	Ortalama Varyasyon Katsayısı
S1	4,2
S2	2,7
S3	3,3
S4	1,8

*S1: Prednizolon asetat içeren PLGA (75:25) stentleri

S2: Prednizolon asetat yüklü mikroküre içeren PLGA (75:25) stentleri

S3: Prednizolon asetat içeren PLGA (50:50) stentleri

S4: Prednizolon asetat yüklü mikroküre içeren PLGA (50:50) stentleri

4.8. Etkin Madde İçeren Kaplı Stent Formülasyonlarının Hazırlanması

4.8.1. Metalik Stentlerin Biyoparçalanır Polimerlerle Kaplanması

Tez çalışmamızda, kaplama yapmak üzere denemeye alınan stentler ticari olarak halen kullanımda olan Nemed firmasınca üretilen paslanmaz çelik stentlerdir. Çalışmalarımızda söz konusu stentlerin etkin madde içeren biyoparçalanır polimerler ile kaplanarak ilaç salan stent yapılarının geliştirilmesi sağlanmıştır.

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda, metalik stentlere kaplama amacıyla kullanılacak olan biyoparçalanır polimerler olarak, PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) kopolimerleri seçilmiştir. Polimer çözücüsü olarak diklorometan kullanılmış ve biyoparçalanır stentlerin üretilmesi amacıyla seçilen % 25 (a/h) konsantrasyonunda polimer çözeltileri hazırlanmıştır. Kaplamanın dayanıklılığını artırmak ve kırılganlığını azaltmak amacıyla % 0,5 (a/h) oranında PEG 4000 plastizer olarak

formülasyona eklenmiştir. Homojen bir karıştırma yapılarak kaplama için kullanılacak polimer çözeltileri hazırlanmıştır (Bkz. Bölüm 3.2.8.1).

Metalik stentlerin kaplanması amacıyla kullanılan yöntemler arasından daldırma (dipping) tekniği ile kaplama yapılmasına karar verilmiştir. Bölüm 3.2.8.1’de anlatıldığı şekilde tellerin ucuna geçirilen metalik stentler bu polimer çözeltilerine daldırılmış ve hazırlama şeması takip edilerek kaplama gerçekleştirilmiştir. Metalik stentlerin kaplanması sırasında stentlerin yerleştirildikleri tellerin üzerinde ilerletilmeleri ile polimer artıkları stentin iç yüzeyinden etkili bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Sabit sıcaklık uygulaması (Kurutma tabancası ile 40 °C) ile kaplama tabakası hızla kurumıştır. Biyoparçalanır polimer ile kaplanan metalik stent üzerine yerleştirildiği telin üzerinden kolayca çıkartılmıştır. Organik çözücünün bütünüyle uzaklaştırılması için etüve yerleştirilen stentlerin kaplama tabakasında kurumaya ve sıcaklığa bağlı bir değişim gözlenmemiştir.

4.8.2. Stentlerin Etkin Madde ve Mikroküre İçeren Polimer Çözeltileriyle Kaplanması

Tez çalışmamızda restenozun önlenmesi amacıyla geliştirilen ilaç salan stent yapılarında kullanılan etkin madde prednizolon asetatın miktarı, biyoparçalanır stent formülasyonlarında da kullanılmış olan stent başına 1 mg etkin madde dozu olarak seçilmiştir. Prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri ise kaplama çözeltileri ile karıştırılırken içerdikleri etkin madde miktarı hesaplanmış ve her stent 1 mg prednizolon asetat içerecek kadar mikroküre polimer çözeltilerine karıştırılmıştır.

Kaplama çözeltileri metalik stentlerin yüzeyine kolayca tutunmuştur. Kaplama tabakasının kurutulması için sıcaklık uygulaması sırasında veya sonrasında, etkin madde ya da mikrokürelerin ortamda bulunması herhangi bir sorun oluşturmamıştır. Metalik stentin yüzeyine kaplanan polimer tabakası kurutulmuştur. Etüvde diklorometanın uzaklaştırılması mümkün olmuş ve yapıda bir bozulma görülmemiştir.

4.9. İlaç Kaplı Stent Formülasyonlarının Karakterizasyonu

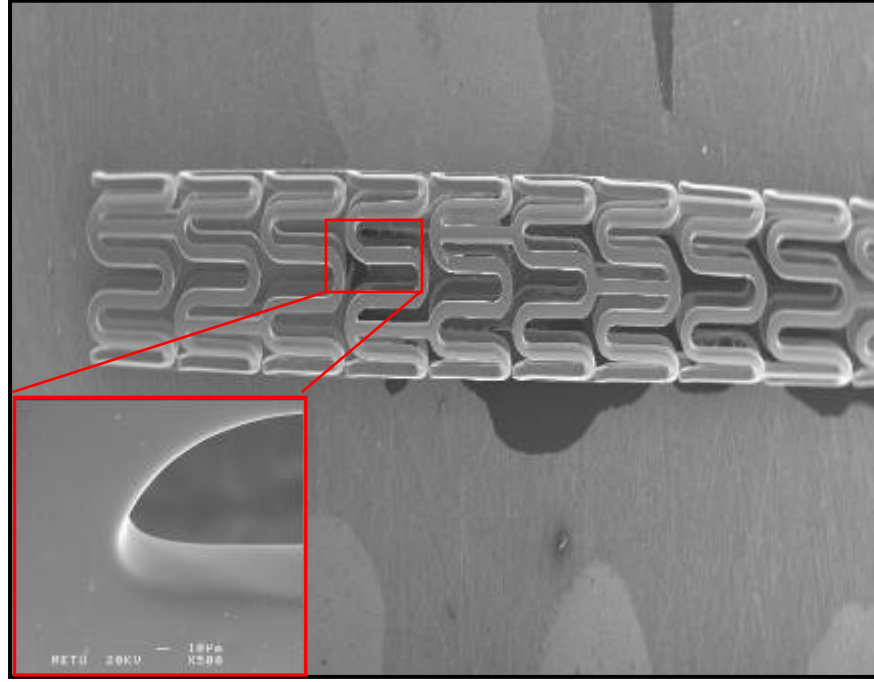
4.9.1. Kaplı Stentlerin Açılma Kontrolü

Etkin madde ya da etkin madde yüklü mikrokürelerin % 25 (a/h) PLGA polimerleri içinde disperse edilmeleriyle hazırlanan kaplama çözeltileri ile kaplanan metalik stentlerin açılma kontrolleri Bölüm 3.2.9.1’de verilmiştir. Anjioplasti balonunun üzerine yerleştirilen kaplı metalik stentler 8 bar basınç uygulandığında tam olarak açılmışlardır. Açılma sonucunda etkin madde içermeyen ve etkin madde/mikroküre içeren stentlerin kaplama tabakasında belirli bölgelerde yırtılmalar gözlenmiştir ve kaplamanın bütünlüğünün kısmen bozulduğu belirlenmiştir. Bu durum polimer çözeltisinin % 25 (a/h)’lik konsantrasyonunun yüksek olduğunu düşündürmektedir. Fakat biyoparçalanır stent formülasyonları ile salım özellikleri açısından karşılaştırmanın yapılabilmesi için polimer konsantrasyonu değiştirilmemiştir.

4.9.2. Kaplı Stentlerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

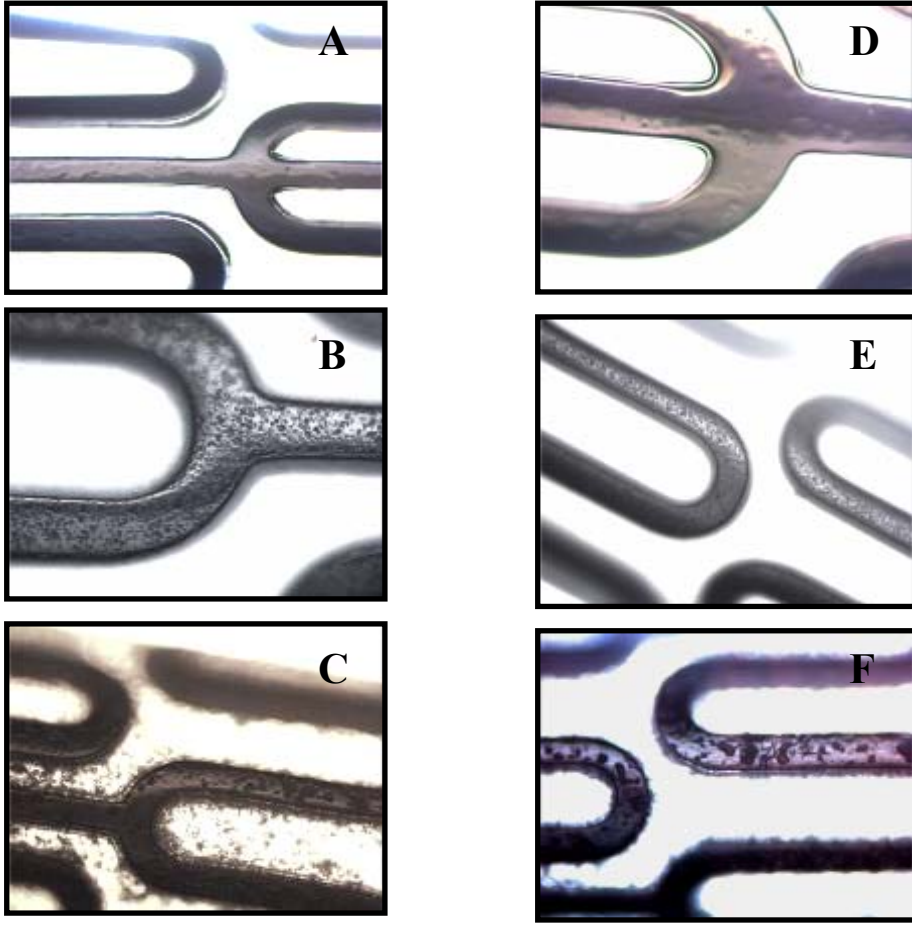
Bölüm 3.2.9.2’de verildiği gibi kaplama yapılan metalik stentlerin yüzey özellikleri ve yapılan kaplamanın etkinliği SEM ile görüntüleme tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.38’de kaplama yapılacak olan metalik stentin SEM fotoğrafları görülmektedir. Kullanılan stent kapalı konumda iken kaplama yapılmıştır ve bu sebepten kapalı konumda olan stentin SEM fotoğrafları verilmiştir. Stentin keskin kenarları ve pürüzsüz yüzeyi ayrıntılı olarak görülmektedir. Kenarların yüksek oranda büyütülerek çekilen fotoğrafında ise, metalik kenarların damar duvarında yaratacakları yaralanmayı azaltmaları için yuvarlatıldıkları görülmektedir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Kaplama yapılmamış durumda ve kapalı haldeki metalik stentin SEM fotoğrafı

% 25 (a/h) konsantrasyonunda PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerleri içinde etkin madde ya da etkin madde yüklü mikroküre disperse edilmesiyle hazırlanan çözeltiler kullanılarak kaplama yapılan metalik stentlerin görüntüleri ve yüzey fotoğrafları SEM analizleri öncesinde ön değerlendirme amacıyla Leica DFC 320 model bilgisayar donanımlı mikroskop sisteminde çekilmiştir. Şekil 4.39A-F’de örnek olarak verilen fotoğraflar yer almaktadır. Fotoğraflardan görüleceği üzere polimer çözeltileri ile yapılan kaplamanın yüzeyi, her iki polimer tipi için pürüzsüz ve düzgün olarak görülmektedir. Prednizolon asetat ya da prednizolon asetat yüklü mikrokürelerin stent yapısına girmesi sonucunda kaplama tabakasında etkin madde ve mikrokürelerin homojen olarak dağıldığı gözlenmektedir.



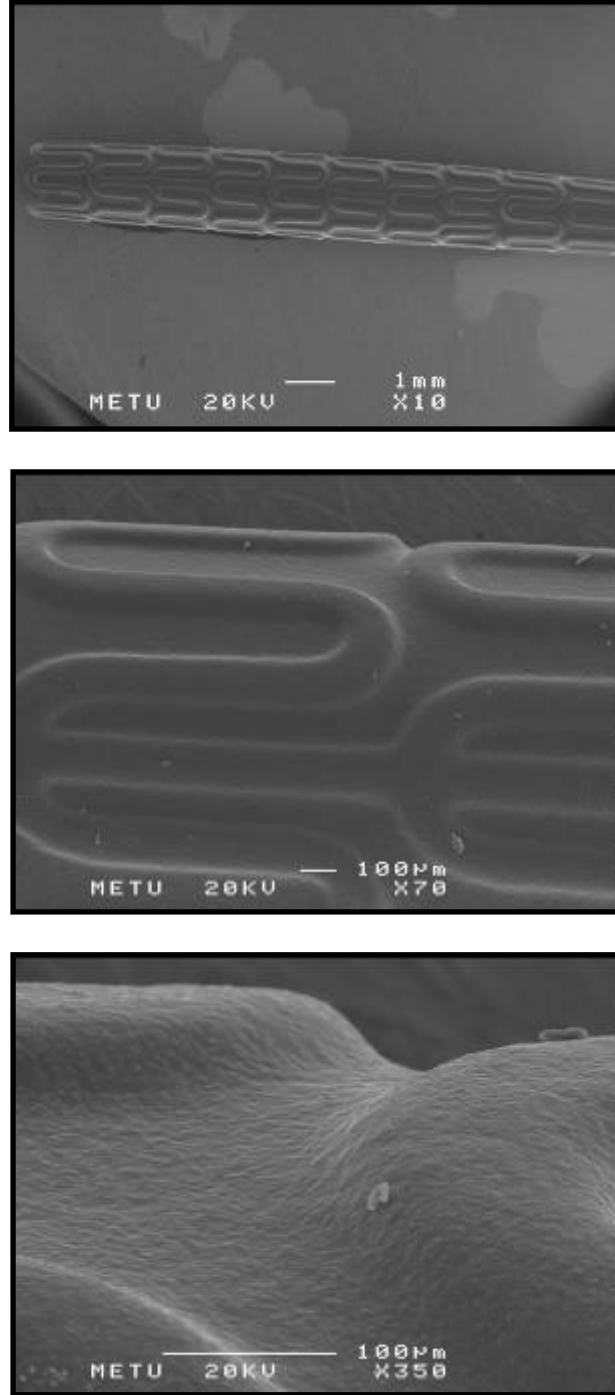
Şekil 4.39. Kaplama yapılan stentlerin dijital makine ile çekilen fotoğrafları

A: PLGA (75:25), B: PLGA (75:25) içinde etkin madde, C:PLGA (75:25) içinde mikroküre
D: PLGA (50:50), E: PLGA (50:50) içinde etkin madde, F: PLGA (50:50) içinde mikroküre

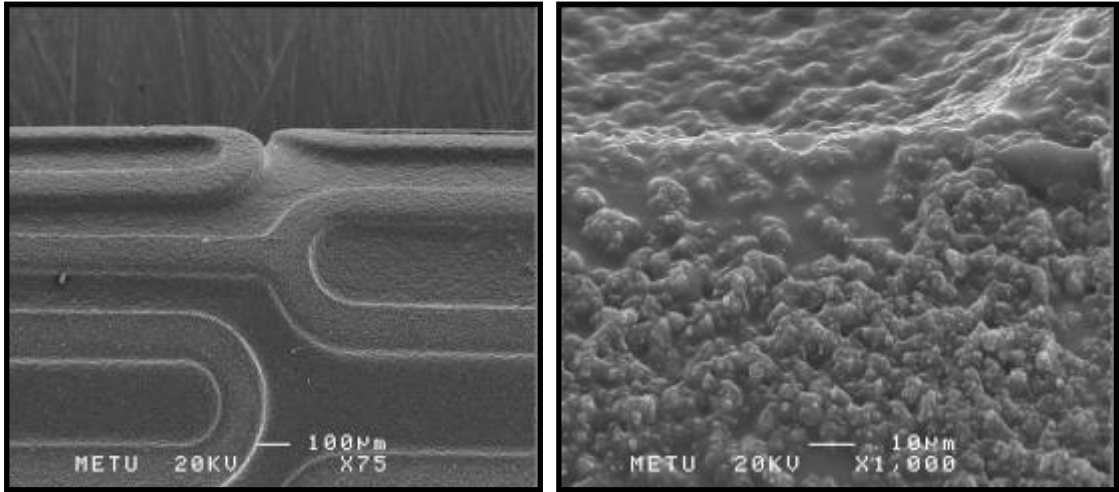
Metalik stentlerin kaplanması için dört farklı polimerik kaplama formülasyonu hazırlanmıştır. PLGA (75:25) polimeri içerisinde prednizolon asetatın disperse edilmesi ile hazırlanan kaplama çözeltisine daldırılarak kaplanmış olan stentlere ilişkin SEM fotoğrafları Şekil 4.40’da verilmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde etkin maddenin polimer matriksi içinde dağıldığı ve kümelenmeye yol açmadığı görülmektedir. PLGA (75:25) polimeri içinde disperse olmuş etkin madde kristalleri gözlenmektedir (Şekil 4.40).

Şekil 4.41’de ise PLGA (50:50) polimeri içinde prednizolon asetat disperse edilerek hazırlanan çözelti kullanılarak kaplanan metalik stent görülmektedir. PLGA (75:25) kullanılarak yapılan kaplamaya benzer olarak etkin madde kristalleri polimer içinde disperse olmuştur. Her iki polimer ile yapılan kaplama sonucunda da kaplama

yüzeyinde yırtılma, çatlama, etkin madde aglomerasyonu ve polimer artıkları görülmemiştir (Şekil 4.40-41).

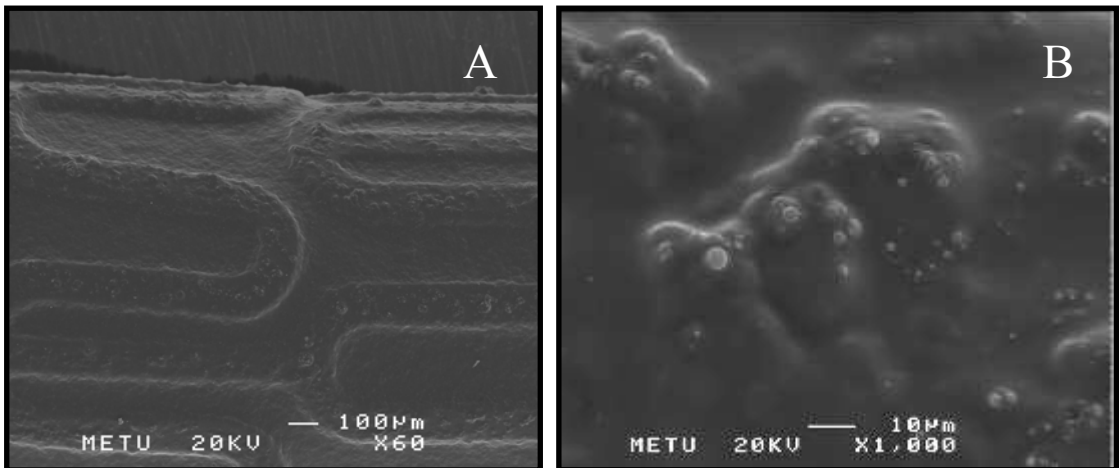


Şekil 4.40. Prednizolon asetat içeren ve PLGA (75:25) çözeltisi ile kaplanmış metalik stentin farklı büyütme oranlarındaki SEM fotoğrafları

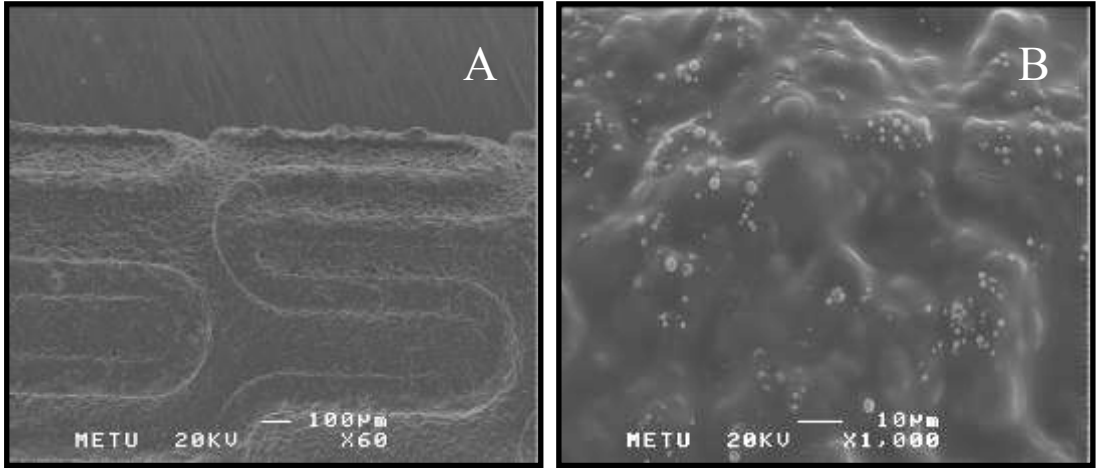


Şekil 4.41. Prednizolon asetat içeren ve PLGA (50:50) çözeltisi ile kaplanmış metalik stentin farklı büyütme oranlarındaki SEM fotoğrafları

Şekil 4.42 ve 43’de metalik stentler üzerine mikroküre içeren PLGA polimerleri kullanarak yapılan kaplamanın SEM fotoğrafları verilmiştir. Yüzey fotoğrafları (Şekil 4.42-B, Şekil 4.43-B) incelendiğinde, mikrokürelerin polimer yapısı içerisinde gömülü olduğu görülmektedir. Biyoparçalanır stent formülasyonlarından farklı olarak yüzeyde mikroküre lokalizasyonu farkedilmektedir.



Şekil 4.42. Metalik stentler üzerine mikroküre içeren PLGA (75:25) polimeri kullanarak yapılan kaplamanın SEM fotoğrafları

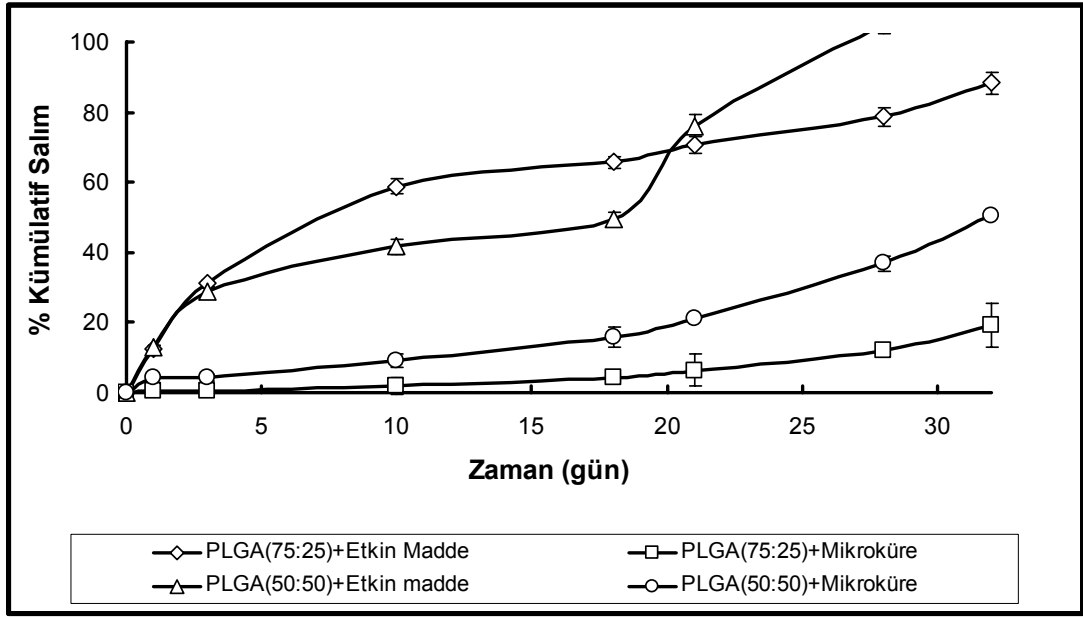


Şekil 4.43. Metalik stentler üzerine mikroküre içeren PLGA (50:50) polimeri kullanarak yapılan kaplamanın SEM fotoğrafları

4.9.3. Prednizolon Asetat ve Prednizolon Asetat Yüklü Mikroküre İçeren Polimerlerle Kaplı Stentlerden İn Vitro Salım Çalışmaları

İlaç salan stent hazırlanması için hazır metalik stentlere PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) kaplamasını takiben prednizolon asetatın in vitro ortamdaki salım özelliklerini araştırmak için Bölüm 3.2.7.4’de verilen yöntem kullanılmıştır.

Salınan prednizolon asetat miktarının tayini için UV spektroskopi yöntemi kullanılmış ve zamana karşı % kümülatif salım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Prednizolon asetat ve prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküre içeren PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimer çözeltileri ile kaplanmış olan metalik stentlerden in vitro salım grafiği Şekil 4.44’de verilmiştir. Grafikte, salım profillerindeki noktalara ait olan standart hata değerlerinin düşük oluşu, her nokta için standart hata çubukları çizilmesine rağmen görülebilmelerine olanak vermemiştir.



Şekil 4.44. PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimeri ile kaplama yapılan metalik stentlerden prednizolon asetat salımı (n=6, $X \pm SS$)

Salım profilleri incelendiğinde, kısa süreli salımın PLGA (50:50) polimeri içinde disperse edilen etkin madde kaplı stentlerden olduğu görülmektedir. Yimisekizinci günün sonunda etkin maddenin tamamının (% 100) salımı gerçekleşmiştir. PLGA (75:25) içinde mikrokürelerin disperse edilmesiyle hazırlanan formülasyonda ise prednizolon asetat salımı, beklendiği üzere oldukça yavaştır. Otuzikinci günün sonunda bu formülasyonla kaplanmış stentlerden salınan % kümülatif etkin madde oranı % 19,1 olarak bulunmuştur.

PLGA (50:50) polimeri içinde mikrokürelerin disperse edilmesiyle hazırlanan çözelti ile kaplanan stentlerden etkin maddenin kümülatif salımı 32. günün sonunda % 50,4 olarak bulunmuştur. Mikrokürelerin kaplama çözeltisinin yapısına girmesi, biyoparçalanır stentlerde gözlenen sonuca paralel olarak etkin maddenin salımını yavaşlatmıştır. PLGA (75:25) polimeri içinde prednizolon asetatın disperse edilmesiyle hazırlanan polimer çözeltisi kullanılarak yapılan kaplama işlemi sonrasında, stentlerden in vitro salınan etkin madde miktarı 32. günün sonunda % 88,3 olarak bulunmuştur.

PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerleri kullanılarak hazır stentlere yapılan kaplamalar sonrası elde edilen salım profilleri incelendiğinde, mikroküre içeren polimerlerle yapılan kaplamalardan etkin maddenin salımının, sadece etkin madde içeren formülasyonlara kıyasla daha yavaş olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kullanılan PLGA polimerleri kopolimer oranlarına göre irdelenecek olursa, PLGA (50:50) ile yapılan kaplama formülasyonlarından etkin madde salımı polimerin hidrofilik özelliğine bağlı olarak PLGA (75:25) polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara göre daha hızlı olarak gerçekleşmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu bölümde tez çalışmaları boyunca sürdürülen deneysel çalışmaların ve bu çalışmalardan elde edilen bulguların değerlendirmesi yapılacak ve bu sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılarak tartışılacaktır. Bu amaçla etkin madde Prednizolon asetatın fizikokimyasal özellikleri ve stabilitesi, 2^2 faktöriyel tasarım kullanılarak kitosan mikroküre formülasyonlarının hazırlanması, üretilen mikrokürelerin in vitro karakterizasyonları (üretim verimleri, partikül büyüklüğü, morfolojik özellikleri, yüklenen etkin madde miktarı, in vitro salım sonuçları), biyoparçalanır polimerlerle hazırlanan stentlerin üretim ve karakterizasyonları (kalınlık, su absorplama, yüzey özellikleri) ve biyoparçalanır polimerlerle kaplama yapılan stentlerin karakterizasyonu değerlendirilmiştir.

5.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri ile İlgili Çalışmalar

Tez çalışmamızda, formülasyon çalışmalarına başlamadan önce prednizolon asetatın fizikokimyasal özellikleri incelenmiş ve sonuçlar literatür verileri ile karşılaştırılmıştır. Prednizolon asetatın miktar tayini için literatürde yer alan yöntemler içinden UV spektroskopisi seçilmiş ve çalışmalarda bu yöntem ile miktar tayini yapılmıştır.

Prednizolon asetatın miktar tayini yönteminin validasyonu ve mikrokürelerden etkin madde içeriği tayini deneyleri için etanolde (% 96'lık) ve salım ortamı olan % 0,5 (a/h) sodyum lauril sülfat ve % 0,05 (a/h) sodyum azid içeren PBS çözeltisinde UV spektrumları çekilmiştir. Salım ortamına konan sodyum azid mikrobiyal kontaminasyonu engellemek amaçlı kullanılmıştır. Prednizolon asetat salım ortamında 247 nm'de λ_{max} vermiştir (Bölüm 4.1.1, Şekil 4.1) ve bu değer farmakopelerde yer alan değerlerle uyum içinde bulunmuştur. Etanolde vermiş olduğu absorbans değeri de yine bu sınırlar içinde bulunmuştur (128). Ayrıca etkin maddenin $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında çekilen IR spektrumu referans spektrumla karşılaştırılmış ve farklı dalga sayılarına karşılık gelen absorbsiyon bantları referans spektrumla uyum içinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.2).

Prednizolon asetatın erime derecesi iki farklı yöntemle tayin edilmiştir. Erime derecesi tayin cihazı kullanılarak elde edilen değer farmakopelerde ve kaynak literatürlerde prednizolon asetatın erime derecesi olarak verilen 235°C (125) ve 237 - 239 °C (127) değerleri ile uyum içindedir.

Prednizolon asetatın DSC termogramı da çekilmiştir (Şekil 4.3). Etkin maddenin mikrokürelerdeki fiziksel formunun araştırılmasında da kullanılacak olan DSC yönteminde referans oluşturması sebebiyle çekilen termogramda prednizolon asetatın keskin bir pik verdiği ve bu pikin de erime derecesine ait olduğu literatürde yer alan veriler ile doğrulanmıştır (126,127).

5.2. Prednizolon Asetatın Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Kullanılan analitik yöntemin validasyonu (Bölüm 3.2.2.2) için yapılan çalışmalarda özgünlük parametresi dikkate alındıktan sonra prednizolon asetatın salım ortamındaki farklı konsantrasyondaki standart çözeltilerinin absorbanları 247 nm’de okunmuş ve kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Çalışılan aralıkta prednizolon asetat için elde edilen kalibrasyon doğrusunun doğrusallığı gösterilmiştir ($R^2 > 0,99$). Diğer validasyon parametreleri olan kesinlik ve doğruluk için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen değerlere ilişkin varyasyon katsayıları literatürde verilerine göre kabul edilebilir sınırlar içinde bulunmuştur (172).

5.3. Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Viskozite Çalışmaları

Bölüm 3.2.3.1’de anlatıldığı üzere kitosan polimerlerinin, tez çalışmamızda kullanılan orta ve düşük molekül ağırlığına sahip tipleri üzerinde yapılan viskozite çalışmaları 25 ± 2 °C sıcaklık ve 76,8 cm/s/cm kayma hızında gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.4).

Elde edilen vizkozite değerlerini incelendiğinde ve orta moleköl ağırlığına sahip olan polimer çözeltileri, farklı konsantrasyonlara göre (% 0,5, % 1 ve % 2 (a/h)) değerlendirildiğinde, polimer konsantrasyonu arttıkça sabit kayma hızındaki (76,8 cm/s/cm) vizkozite değerlerinin sırasıyla 97,3, 363,5 ve 1782,1 miliPascal.saniye olduğu görölmektedir. Polimer konsantrasyonu ile vizkozite arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde farkın anlamlı olduğu görölmüştür ($p < 0,05$). Benzer şekilde düşük moleköl ağırlığına sahip olan polimer çözeltileri, farklı konsantrasyonlara göre (% 0,5, % 1 ve % 2 (a/h)) değerlendirildiğinde, polimer konsantrasyonu arttıkça sabit kayma hızındaki (76,8 cm/s/cm) vizkozite değerlerinin sırasıyla 52,9, 205,6 ve 853,3 miliPascal.saniye olduğu bulunmuştur. Düşük moleköl ağırlığına sahip polimer konsantrasyonu ile vizkozite arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendiğinde farkın anlamlı olduğu görölmüştür ($p < 0,05$).

Aynı konsatrasyondaki (% 0,5, % 1 ve % 2) farklı moleköl ağırlığındaki (orta ve düşük) polimer çözeltilerine ilişkin değerler irdelendiğinde, orta moleköl ağırlığına sahip kitosan polimeri çözeltilerinin her konsantrasyon değerinde düşük moleköl ağırlığındaki tipine göre daha viskoz olduğu görölmektedir (Tablo 4.5).

Düşük ve orta moleköl ağırlığına sahip kitosan polimerlerinin farklı konsantrasyonlarda (% 0,5, % 1 ve % 2) hazırlanan çözeltilerinin 25 ± 2 °C sıcaklıkta, kayma hızına karşı kayma gerilimi değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen akış eğrileri incelendiğinde polimer çözeltilerinin psödoplastik akış özelliği gösterdiği bulunmuştur (şekil 4.5-6). Farklı moleköl ağırlığına sahip kitosan tiplerinin viskoziteleri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda çalışmalarımızda bulduğumuz sonuçlar literatürde yer alan sonuçlar ile uyum içindedir (98,173).

DSC Termogramlarının İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.2’de açıklanan şekilde geręekleřtirilen DSC çalışmalarında, mikroküre formölasyonlarının hazırlanmasında kullanılan orta ve düşük moleköl ağırlığına sahip kitosan polimerlerinin termogramları çekilmiştir (şekil 4.7-8). Düşük

molekül ağırlığına sahip kitosan polimerinin termogramında 91,18 °C’de yayvan bir pik görülmektedir. Aynı şekilde, orta molekül ağırlığına sahip kitosan polimeri tipinde ise 120,28 °C’de yayvan bir pik görülmüştür. Bu pikler, doğal bir polimer olan kitosanın yapısında yer alan suyun buharlaşma pikidir ve literatürde yer alan veriler bu durumu doğrulamaktadır (110,150). Orta molekül ağırlığına sahip olan kitosan polimerinde görülen suyun buharlaşma piki, düşük molekül ağırlıklı tipine göre biraz daha yüksek bir sıcaklık değerinde gözlenmiştir. Bu da kitosanın molekül ağırlığı arttıkça yapısında yer alan su moleküllerini daha çok tuttuğunu ve buharlaşmalarının geciktirdiğini göstermektedir (150).

Biyoparçalanır stent formülasyonlarının ve stent kaplama çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan sentetik biyoparçalanır polimerler olan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50)’nin termal özellikleri de Bölüm 3.2.3.2’de verildiği şekilde DSC ile incelenmiştir. PLGA (50:50) polimerine ilişkin camsı geçiş sıcaklığı 34 °C civarında gözlenirken, PLGA (75:25) polimeri için bu değer 46 °C civarında tespit edilmiştir. Polimerlerdeki laktik asit monomerinin oranında artış olması camsı geçiş sıcaklığını arttırmıştır. Bu sonuçlar literatür ile uyum içindedir (76).

5.4. Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması

5.4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Mikrokürelerin hazırlanması amacıyla toksik özellik göstermeyen, antijenik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen doğal bir polimer olan kitosan seçilmiştir. Mikroküre formülasyon çalışmalarında kitosanın iki farklı molekül ağırlığına sahip tipi (düşük M.A: 150.000 Da, ve orta M.A: 400.000 Da) kullanılmıştır.

Kitosan polimeri ile farklı üretim teknikleri kullanılarak yapılmış olan mikroküre çalışmaları literatürde yer almaktadır (98,103,151). Tez çalışmamızda mikroküre üretim yöntemi olarak püskürterek kurutma tekniği; istenen boyutlarda (1-10 µm) mikroküre üretilmesini sağladığı ve organik çözücü kullanımını gerektirmediği için tercih edilmiştir (101,109,115,116,118). Püskürterek kurutma

yöntemi ile mikroküre formülasyonlarının hazırlanması amacıyla kullanılması düşünülen kitosan polimerinin düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı tipleri kullanılarak ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yüksek molekül ağırlığına sahip olan kitosan polimerinin % 1'lik (a/h) laktik asit çözeltisinde çözünmesi sonucu oluşturduğu çözeltilerin bütün konsantrasyonlarda viskozitelerinin çok yüksek oluşu, püskürterek kurutma işlemi sırasında iğnenin tıkanmasına yol açmıştır. Püskürterek kurutma işleminde son ürünün partikül büyüklüğü üzerinde en çok etkili olan işlem değişkenlerinden birisi de iğne açıklığıdır (110). Tez çalışmalarımızda 1-10 μm aralığında partikül büyüklüklerine sahip mikroküreler elde edilebilmesi için 0,7 ve 0,5 mm'lik açıklığa sahip iğne uçları içerisinde 0,5 mm açıklıktaki seçilmiştir. Bununla beraber küçük iğne açıklığı viskoz çözeltilerin bu açıklığı tıkamasını kolaylaştırmış, bu durum da üretim verimini azaltmıştır. Sonuç olarak; kitosan polimerinin orta ve düşük molekül ağırlıklı tiplerinin kullanıldığı 97,3 – 367,5 miliPascal.saniye aralığında viskoziteye sahip farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile formülasyonların geliştirilmesine karar verilmiştir.

Püskürterek kurutma işlemi ile üretilecek mikroküre formülasyonlarında kullanılacak olan kitosan çözeltilerinin uygun konsantrasyonlarının araştırılması ve değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, % 0,1 (a/h), % 0,5 (a/h) ve % 1 (a/h) ve % 2 (a/h) konsantrasyonlarındaki çözeltileri hazırlanmıştır. Kitosan polimerinin tipinden bağımsız olarak hazırlanan % 2 (a/h) konsantrasyondaki çözeltiler viskozitelerinin yüksekliğine bağlı olarak püskürtme işlemi sırasında iğnede tıkanmalara yol açmıştır. % 0,1 (a/h) konsantrasyonunda hazırlanan kitosan çözeltileri ile (düşük ve orta molekül ağırlıklı) üretim sırasında üretim verimi % 10'un altında bulunmuştur. Sonuçta; kitosan düşük ve orta molekül ağırlıklı polimerleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda polimer konsantrasyonları % 0,5 (a/h) ve % 1 (a/h) olarak seçilmiştir.

Hazırlanacak mikroküre formülasyonlarının küresellikleri de araştırılmıştır. Orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerinin % 0,5 ve % 1'lik çözeltileri

kullanılarak üretilen mikrokürelerin şekilleri, Leica optik mikroskobu ile araştırılmış ve bütün formülasyonların küresel oldukları görülmüştür.

Kitosan polimerlerinin deneyler sırasında kullanılması olası organik çözücülerle bir etkileşiminin olup olmadığı araştırılmıştır. Kitosan düşük ve orta molekül ağırlıklı polimerlerinin % 1 (a/h)'lik laktik asitte % 1 (a/a)'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Bu polimer çözeltileri 1:1 (h/h) oranında alkol, diklorometan ve aseton ile karıştırılmıştır. Bir gün boyunca oda sıcaklığında ağzı sıkı kapalı kaplarda bekletilen karışımlarda herhangi bir fiziksel bozunma gözlenmemiştir.

5.4.2. Faktöriyel Tasarım

Mikroküre formülasyonlarının doğal bir polimer olan kitosan ile hazırlanması için 2^2 faktöriyel tasarım kullanılmıştır. Bu istatistiksel yöntem kullanılarak farklı formülasyon parametrelerinin mikroküre özellikleri üzerine etkisi ayrıntılı bir biçimde incelenmiştir.

Faktöriyel tasarım her bir faktörün farklı düzeylerini aynı anda inceleme imkanı sağlar (121). 2^2 faktöriyel tasarımda, polimer konsantrasyonu (%) ve hedeflenen etkin madde yükleme oranı (%) etkenleri üzerinde çalışılmıştır. Bağımsız değişken olarak belirlenen bu iki etkenden, polimer konsantrasyonu (% 0,5 ve % 1 (a/h)) ve hedeflenen etkin madde yükleme oranı (% 10 ve % 20 (a/h)) için iki seviye belirlenmiştir. Mikroküre formülasyonlarında faktöriyel tasarım yapılırken ortalama partikül büyüklüğü, mikrokürelere yüklenen prednizolon asetat miktarı ve t_{50} değerleri bağımlı değişken olarak seçilmiştir. Optimizasyon işlemi sonucunda, seçilen bağımlı değişkenler ile etkin madde içeriği yüksek, küçük partikül büyüklüğüne sahip ve uzun süreli salım sağlayan mikroküre formülasyonunun hazırlanması hedeflenmiştir.

Regresyon analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar polinomial denklemler halinde gösterilmiştir. Bu denklemlerde x_1 (% polimer konsantrasyonu) ve x_2 (% hedeflenen etkin madde oranı) terimleri ana etkileri gösterirken x_1 ve x_2 'nin çarpımı olan terim

bu etkenler arasındaki etkileşmeyi göstermektedir. Terimlerin önünde bulunan (+) değerler bağımlı değişkenler ile pozitif ilişkiyi, (-) değerler ise negatif ilişkiyi yansıtmaktadır. Her bir terimin önünde bulunan β değerinin büyüklüğü bağımlı değişken üzerine olan etkinin büyüklüğünü ifade eder (121). Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'deki değerler incelendiğinde bağımsız değişkenlerin etkin düzeyleri ve yönleri değerlendirilebilir. Regresyon analizi sonucu elde edilen polinomial denklemler ifade edilirken, Y_1 - Y_3 no'lu fonksiyonlara ait denklemler orta molekül ağırlıklı kitosan formülasyonları için sırasıyla ortalama partikül büyüklüğüne, % yükleme oranına ve $t_{\%50}$ ' ye aittir. Y_4 - Y_6 no'lu fonksiyonlara ait denklemler ise düşük molekül ağırlıklı kitosan formülasyonları için sırasıyla ortalama partikül büyüklüğüne, % yükleme oranına ve $t_{\%50}$ ' ye aittir.

Faktöriyel tasarımda regresyon analizi sonucunda elde edilen denklemlere ait cevap yüzey grafikleri çizilebilir. Böylece denklemin ifade ettiği ilişkinin uzaydaki profili gösterilir ve görsel olarak ilişkinin yönü ve seviyesi görülebilir. Ayrıca bu grafikler sayesinde etkenler arasında bir etkileşme olup olmadığının da değerlendirilmesi daha kolay yapılabilir (121,122). Tez çalışmamızda uygulanan 2^2 faktöriyel tasarımda regresyon analizi sonucunda elde edilen $y_1 - y_6$ denklemlerine ilişkin cevap yüzey grafikleri de ayrıca verilmiştir (Şekil 4.9-14)

Düşük veya orta molekül ağırlığına sahip kitosan mikrokürelerin formülasyonu sırasında uygulanan 2^2 faktöriyel tasarımı ile elde edilen sonuçlara göre bağımsız değişkenlerimiz % polimer konsantrasyonu ve % hedeflenen etkin madde oranı, bağımlı değişkenlerimiz olan ortalama partikül büyüklüğü, mikrokürelerin içerdiği prednizolon asetat miktarı ve $t_{\%50}$ değerleri üzerinde etkisi istatistiksel olarak incelenmiştir. Analiz sonuçları ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

5.4.3. Püskürterek Kurutma Yöntemi ile Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması

Kitosan polimeri kullanılarak üretilcek mikroküreler için püskürterek kurutma yöntemi seçilmiştir. Bu yöntem hızlı, yüksek üretim verimi sağlayan bir yöntemdir (101,103,109,115,174). Ayrıca püskürterek kurutma yönteminde sulu sistemlerle çalışılabilmesi ve organik bir çözücü kullanımını gerektirmemesi bu yöntemin seçilmesini sağlamıştır (109,110,115).

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda, mikroküre formülasyonlarının geliştirilmesi için kitosan polimerinin orta ve düşük molekül ağırlığına sahip türlerinin % 0,5 ve % 1 (a/h) konsantrasyondaki çözeltilerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu konsantrasyonlardaki kitosan çözeltileri literatürde de püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan formülasyonlarda sıklıkla kullanılmaktadırlar (101,105,109, 110,113, 117,175).

Etkin madde içeren mikrokürelerin hazırlanması için prednizolon asetatın kitosan polimer çözeltileri içinde çözünmesi ve/veya disperse edilmeleri gerekmektedir. Etkin maddemiz olan prednizolon asetat, suda pratik olarak çözünmeyen bir maddedir (126,127). Bu nedenle kitosan polimerlerinin çözücüsü olan % 1 (h/h)'lik laktik asit çözeltisi ile karışabilen ve prednizolon asetatı çözebilen bir çözücü kullanılması gerekmiştir. Literatürde etkin maddenin etanol, aseton ve metanol gibi organik çözücülerde çözünerek kitosan polimer çözeltilerine karıştırılarak hazırlandığı mikroküre formülasyon örnekleri bulunmaktadır (105,111,119,150). Etkin maddenin etanol içinde çözüldükten sonra polimer çözeltisine karıştırılması fiziksel bir geçimsizlik göstermemiştir.

Bütün bu ön formülasyon çalışmaları sonucunda orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılmasına, üretilcek olan formülasyonlarda polimer konsantrasyonunun % 0,5 ve % 1 (a/h) olmasına, prednizolon asetatın polimer çözeltisi ile karıştırılması için çözündürüleceği çözücü olarak etanol kullanılmasına karar verilmiştir.

Püskürterek kurutma yöntemi kitosan mikrokürelerinin hazırlanması amacıyla son yıllarda literatürde sıklıkla kullanılan bir yöntem olarak dikkat çekmektedir (109,117-119,175). Yöntem, hazırlanan etkin madde içeren polimer çözeltisinin sıcaklık uygulaması ile birlikte püskürtülmesi esasına dayanmaktadır. Püskürterek kurutma yönteminde etkin madde olarak suda çözünebilen ya da çözünmeyen ilaçlar kullanılabilir (101,105,110,115).

Üretim yöntemi göz önüne alındığında orta molekül ağırlıklı kitosan ve yüksek polimer oranı kullanıldığında üretilen mikroküre formülasyonlarının (% 1 (a/h) kitosan ve % 20 (a/a) prednizolon asetat) yüksek verimle, tekrarlanabilir olarak üretilbildiği, hazırlanan mikrokürelerin siklon ve diğer cam parçalara yapışmadan ve önemli bir kayba uğramadan toplama kabında toplandığı görülmüştür. Etkin madde yükleme oranının değişmesi (% 10 – 20) ise üretim yönteminin veriminde ve üretim basamaklarında bir farklılık yaratmamıştır (110)

Püskürterek kurutma yöntemi ile mikroküreler hazırlanırken giriş sıcaklığı ön çalışmalar sonucunda 130 °C olarak tespit edilmiştir. Püskürterek kurutma yöntemi çözücü buharlaşması esasına dayanmaktadır (98,103,110). Suyun buharlaşma ısısı 100 °C olduğu için çözücü olarak su kullanılan durumlarda sıcaklığın bu seviyenin üstüne ayarlanması gerekmektedir (101,110).

Tez çalışmamızda kullanılan polimerin tipi, konsantrasyonu ve etkin madde yükleme oranı göz önüne alındığında optik mikroskop ile yapılan ön incelemeler sonucunda geliştirilen bütün formülasyonların küresel yapıda olduğu gözlenmiş ve seçilen püskürterek kurutma yönteminin küresel partiküller oluşturmak için uygun bir yöntem olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Mikroküre formülasyonlarında kitosan polimerlerinin çözücüsü olarak sulu bir ortam kullanılması (% 1 (h/h)'lık laktik asitin sulu çözeltisi) ve organik çözücü kullanımına gerek kalmaması bu yöntemin sağladığı bir üstünlüktür (109,110,115). Sonuç olarak püskürterek kurutma yöntemi hızlı, kolay uygulanabilir, organik

çözücü kullanımını gerektirmeyen ve optimize edildikten sonra tekrarlanabilirliği yüksek bir üretim yöntemi olması gibi üstünlükleri nedeniyle seçilmiştir.

5.5. Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Bu bölümde, püskürterek kurutma yöntemi ve 2^2 faktöriyel tasarım kullanılarak hazırlanan kitosan mikroküre formülasyonları üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları ve sonuçları değerlendirilecektir. Bu amaçla morfolojik özelliklerin incelenmesi, partikül büyüklüğü tayini, hazırlama verimi, mikrokürelere yüklenen prednizolon asetat miktar tayini çalışmaları ve in vitro salım deneyleri tartışılmıştır.

5.5.1. Morfolojik Özellikler

Ön formülasyon çalışmaları sonrasında optimize edilen orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerleri kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının yüzey özelliklerinin incelenmesi için SEM fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.15-18).

SEM fotoğrafları incelendiğinde, düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlarda (Şekil 4.17 A-G) polimer konsantrasyonunun değişmesi (% 0,5 - % 1) mikrokürelerin yüzey özelliklerini ve küreselliklerini değiştirmemiştir. Etkin madde oranının artması ya da azalmasının (% 10 - % 20) morfolojik özellikler üzerinde etkili olmadığı, bütün formülasyonların tamamen küresele yakın ve gözeneksiz yapıda olduğu görülmüştür.

Orta molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlara (Şekil 4.18 A-G) ilişkin SEM fotoğrafları incelendiğinde yine polimer konsantrasyonu ve etkin madde yükleme oranının mikrokürelerin düzgün ve gözeneksiz yüzey özelliklerini ve küresel yapılarını değiştirmedeği görülmüştür. Ayrıca iki farklı polimer tipiyle hazırlanan mikroküre formülasyonlarında herhangi bir agregasyon oluşumuna rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, polimer konsantrasyonundaki ya da hedeflenen etkin madde oranındaki değişiklik mikrokürelerin yapıları ve yüzey özellikleri üzerinde gözlenebilen bir etki oluşturmamıştır. Literatürde bu etkenlerin mikrokürelerin morfolojik özelliklerinde etkili olmadığını gösteren ve ulaştığımız sonuçları destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (119,174).

Literatürde püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikroküre çalışmalarında da elde edilen mikroküreler benzer şekilde oldukça küresel bir yapı göstermektedir (101,109,112,115,118,119). Bununla birlikte, literatürde püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan ve gözenekli yapı gösteren mikroküre formülasyonlarına ilişkin değişik çalışmalar da yer almaktadır (116,117,120).

5.5.2. Partikül Büyüklüğü Tayini

Püskürterek kurutma yöntemine göre elde edilen mikrokürelerin partikül büyüklüklerini etkileyen faktörler arasında iğne ucu açıklığı, polimer konsantrasyonu, kurutma için kullanılan basınçlı havanın hızı ve birim zamanda püskürtülen çözelti miktarı bulunmaktadır (101,110). Ön deneysel çalışmalar sonucunda, partikül büyüklüğü ve dağılımını etkileyen bu parametrelerin optimize edilerek sabit tutulmasına karar verilmiştir. İğne ucu açıklığı 0,5 mm, basınçlı havanın akış hızı 600 Nl/saat, aspiratör seviyesi -30 mbar ve birim zamanda püskürtülen çözelti miktarı 5 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Böylece partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı üzerinde yöntem parametrelerinin etkisi kontrollü ve sabit tutulabilmiştir..

Bölüm 3.2.5.2’de verildiği şekilde, orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerleri kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklükleri incelendiğinde bütün formülasyonların partikül büyüklüklerinin 4,13 – 11,65 μm aralığında yer aldığı görülmüştür. Literatürde yer alan kitosan polimeri ve püskürterek kurutma tekniği kullanılarak hazırlanan mikroküre çalışmalarında benzer partikül boyutlarına sahip mikroküreler elde edildiği belirtilmiştir (101,110,115,118,119,174).

Elde edilen partikül büyüklüğü değerleri ve SEM fotoğraflarına bakıldığında, tez çalışmamız kapsamında düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan polimerleri kullanarak üretmiş olduğumuz mikrokürelerin küçük partikül büyüklüğüne sahip olduğu ve partikül büyüklüğü dağılımının geniş bir aralıkta olmadığı görülmektedir (Şekil 4.19). Benzer sonuçlar literatürde yer alan çalışmalarda da bildirilmektedir (115,118,119). Bununla beraber, Martinac ve diğ. (174) gerçekleştirdikleri çalışmalarda düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan tipleri kullanarak püskürterek kurutma tekniği ile mikroküre üretmişler fakat elde edilen kürelerin partikül büyüklüğü dağılımının geniş bir aralıkta olduğunu gözlemişlerdir.

Tez çalışmamızda, polimer konsantrasyonları ve hedeflenen etkin madde yükleme oranları arasındaki farkın incelenmesi için 2^2 faktöriyel tasarım kullanılarak bağımlı değişkenlerden mikrokürelerin ortalama partikül büyüklükleri arasında karşılaştırmalar yapılmış ve farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Üretilen mikroküre formülasyonları arasında, orta molekül ağırlığına sahip kitosan kullanılarak üretilen formülasyonlar kendi aralarında değerlendirildiklerinde, polimer oranındaki artışın (% 0,5 ya da % 1) ve etkin madde yükleme oranının (% 10 ya da % 20) partikül büyüklükleri üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde orta molekül ağırlığına sahip kitosan polimeri ile geliştirilen formülasyonların partikül büyüklükleri de polimer konsantrasyonundan ve etkin madde yükleme oranından etkilenmiştir. Aynı polimer konsantrasyonunda farklı polimer tipine sahip olan kitosan mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklükleri karşılaştırıldığında da polimer tipinin istatistiksel olarak partikül büyüklüğü üzerinde etkili olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Literatürde, kullanılan kitosan polimerinin molekül ağırlığı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığını gösteren çalışmalar (101) ve etkin maddenin oranı arttıkça partikül büyüklüğünün arttırdığını gösteren çalışmalar (119) olduğu gibi polimer tipi ve ilaç yükleme oranının partikül büyüklüğü üzerinde etkili olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (118,174). Bu sonuçlar, partikül büyüklüğü üzerinde etkili olan parametrelerin formülasyondan ziyade üretim yöntemindeki değişkenlerden kaynaklandığını göstermektedir (110).

Partikül büyüklüğü tayini sonuçları, kullanılan püskürterek kurutma yönteminin, genel olarak 2-10 μm büyüklüğünde, küresel ve düzgün yüzeyli, homojen dağılımlı mikroküreler üretilmesine izin veren bir yöntem olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara dayalı benzer değerlendirmelerin yapıldığı çalışmalar literatürde yer almaktadır (110,115,116,118,119).

Tez çalışmamızda, hazırlanacak mikroküre formülasyonlarının kullanım amacı, uzun süreli ve kontrollü etkin madde salımı sağlayabilecek bir sistem oluşturmaktır. Mikrokürelerin yaklaşık olarak 5 – 10 μm büyüklüğünde olması, geliştirilecek olan biyoparçalanır stent formülasyonları ve biyoparçalanır polimerle kaplı stent yapılarının hazırlanmasında kullanılan biyoparçalanır polimer çözeltileri içinde daha kolay disperse edilebilmelerini sağlamaktadır. Bu amaçla püskürterek kurutma tekniği seçilerek 5 – 10 μm partikül boyutlarına sahip mikroküreler üretilmiştir.

5.5.3. Mikrokürelerin Üretim Verimi

Mikrokürelerin üretim verimi Bölüm 3.2.5.3'te verildiği üzere püskürterek kurutma yöntemi ile formülasyonların üretilmesini takiben hesaplanmıştır. Tablo 4.10'da görülen formülasyonlara ilişkin üretim verimleri, % 21,6 ile % 70,6 arasında değişmektedir.

Püskürterek kurutma tekniği ile hazırladığımız kitosan mikroküre formülasyonlarımızın üretim verimleri, düşük molekül ağırlıklı kitosan polimeri grubu içinde polimer konsantrasyonu % 0,5'den % 1'e artırılmasıyla birlikte etkin madde içermeyen mikroküreler için % 29,6'dan % 55'e, etkin madde içeren mikroküre formülasyonlarında ise % 30,5'den % 70,6'ya çıkmıştır. Düşük molekül ağırlıklı kitosan mikrokürelerinin verimleri, aynı polimer oranı ve hedeflenen etkin madde yükleme oranı içeren orta molekül ağırlıklı kitosan mikroküre formülasyonları ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.

Literatürde farklı molekül ağırlığına sahip kitosan polimerleri kullanılarak geliştirilen formülasyonlar püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlandığında, elde edilen üretim verimleri değerlendirilmiştir. Desai ve Park (109) yaptıkları çalışmada orta molekül ağırlıklı kitosan kullanarak hazırladıkları mikrokürelerin üretim verimlerini % 60 civarında bulmuşlardır. Gavini ve diğ. (118) de düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırladıkları mikrokürelerin üretim verimini % 30 ile % 50 arasında bulmuştur. Giunchedi ve diğ. (115) yaptıkları çalışmada ilaç yüklü olmayan kitosan mikrokürelerinin üretim verimini yaklaşık % 55 bulurken, ilaç yüklü olan formülasyonların üretim verimlerini yaklaşık % 65 olarak bildirmişlerdir. Huang ve diğ. (176) yaptıkları çalışmada üretim veriminin etkin madde oranı arttıkça yükseldiğini bulmuşlardır. Filipovic – Greic ve diğ. (111) kitosan mikroküreleri hazırlamış ve etkin madde olarak hidrokortizon ve hidrokortizon – siklodekstrin kompleksini kullanmışlardır. Fakat etkin maddenin kompleks yapısı üretim verimi üzerinde bir etki yaratmamış ve araştırmacılar bu çalışmada % 59 ve % 65 arasında değişen üretim verimi bulgularını bildirmişlerdir.

Tez çalışmalarımızda kitosan mikroküreleri üretim verimi araştırmaları sonucunda elde edilen değerler literatürle uyumlu bulunmuştur. Bununla beraber düşük üretim verimlerinin, her bir seride kullanılan polimer çözeltisi miktarının azlığından (100 mL) ve cihazın aspiratör çıkışında küçük partiküllerin tutulması için bir filtre olmaması dolayısıyla belli büyüklük altındaki mikrokürelerin de vakumla çekilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (115,118).

5.5.4. Mikrokürelere Yüklenen Prednizolon Asetat Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda optimize edilen, düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan mikroküre formülasyonlarına yüklenen prednizolon asetatin miktarı ve bu yükleme etkinliği Bölüm 3.2.5.4’de verildiği şekilde incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tez çalışmalarımızda polimer konsantrasyonları ve hedeflenen etkin madde yükleme oranları arasındaki farkın incelenmesi için 2^2 faktöriyel tasarım kullanılarak bağımlı değişkenlerden yüklenen etkin madde miktarları arasında karşılaştırmalar yapılmış ve farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Düşük ve orta molekül ağırlıklı polimerler kullanılarak elde edilen polinomial denklemlerde görüleceği üzere (Tablo 4.7 ve Tablo 4.8) bağımsız değişken x_1 'in (polimer konsantrasyonu) ve x_2 'nin (hedeflenen yükleme oranı) bağımlı değişken yüklenen etkin madde miktarı üzerinde pozitif yönde etkisi olduğu bulunmuştur (Tablo 4.7, Y_2 ve Tablo 4.8, Y_5 polinomial denklemleri).

Etkin madde prednizolon asetatın düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan mikrokürelerine yüklenen oranları ve buna bağlı olarak yükleme etkinliği polimer konsantrasyonu düşük seviyede tutulduğunda (% 0,5), hedeflenen etkin madde oranındaki artış ile önemli ölçüde arttırılmıştır. Polimer konsantrasyonun artması ise (% 1) yüklenen prednizolon asetat miktarını önemli ölçüde arttırmıştır. Yüksek polimer konsantrasyonunda çalışıldığında (% 1), etkin madde oranındaki artış (% 10 ve % 20) mikrokürelere yüklenen prednizolon asetatın yükleme etkinliğinde bir artışa yol açmamıştır.

Literatürde püskürterek kurutma yöntemi ile mikroküre formülasyonlarında yapılan etkin madde yükleme çalışmalarında; Ganza-Gonzales ve diğ. (116) metoklopramidin yükleme etkinliğini % 63,3 - % 70,8 aralığında bulmuşlardır. Desai ve Park (109) vitamin C kullandıkları çalışmalarında etkin maddenin enkapsüle edilebilme etkinliğininin % 45,05 - % 58,30 aralığında olduğunu belirtmişlerdir. Martinac ve diğ. (174) ise farklı kitosan polimerleri karışımları kullanarak gemfibrazilin yükleme etkinliğini arttırmaya çalışmış ve yükleme etkinliklerini % 67-%98 aralığında bulmuşlardır. Literatürde yükleme etkinliğinin araştırılması için yapılan çalışmalar tez çalışmamızda elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

5.5.5. DSC ile Mikrokürelerin Termodinamik Özelliklerinin Araştırılması

Bölüm 3.2.5.6'da kitosan mikrokürelerinin termal özelliklerinin incelenmesi için gerçekleştirilen DSC analizlerinin uygulama yöntemi verilmiştir.

Çekilen DSC termogramları incelendiğinde (Şekil 4.20-21) orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan polimerleri kullanılarak hazırlanan etkin madde içermeyen mikroküreler ile etkin madde içeren mikrokürelerin termogramlarının birbirleriyle örtüştüğü gözlemlenmiştir. Formülasyona giren kitosan polimerinin tek başına prednizolon asetatın 237,09 °C’da vermiş olduğu endotermik erime piki ile bir etkileşme yapmadığı gösterilmiştir. Etkin madde yüklenmiş mikrokürelerde ise prednizolon asetata ilişkin erime piki ortadan kaybolmuştur. Bu durum etkin maddenin kitosan matriksi içinde homojen ve katı halde disperse olduğunu, kristalize yapısının ortadan kalkarak amorf halde mikroküre yapısına girdiğini göstermektedir. Literatürde yer alan çalışmalar elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir (101, 111,115,175).

5.5.6. İn Vitro Salım Deneyleri

Tez çalışmalarımızda polimer konsantrasyonları ve hedeflenen etkin madde yükleme oranları arasındaki farkın incelenmesi için 2^2 faktöriyel tasarım kullanılarak bağımlı değişkenlerden $t_{\%50}$ değerleri arasında karşılaştırmalar yapılmış ve farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Düşük ve orta molekül ağırlıklı polimerler kullanılarak elde edilen polinomial denklemlerde görüleceği üzere bağımsız değişken x_1 ’in (polimer konsantrasyonu) ve x_2 ’nin (hedeflenen yükleme oranı) bağımlı değişken $t_{\%50}$ değeri üzerinde pozitif yönde etkisi olduğu bulunmuştur (Tablo 4.7, Y_3 ve Tablo 4.8, Y_6 polinomial denklemleri).

Düşük molekül ağırlığına sahip kitosan polimeri kullanılarak hazırlanan mikrokürelerde, in vitro ortamda yapılan salım deneyleri sonucunda elde edilen $t_{\%50}$ değerleri 14,2 saat ile 57,2 saat arasında bulunmuştur. Bu formülasyonlara ilişkin $t_{\%50}$ değerleri incelendiğinde, düşük molekül ağırlığına (% 0,5) ve düşük etkin madde yükleme oranına (% 10) sahip mikroküre formülasyonunda (CL0,5PA10) $t_{\%50}$ değeri en düşük (14,2 saat), yüksek polimer konsantrasyonu ve yüksek etkin madde yükleme oranına sahip formülasyonda (CL1PA20) ise $t_{\%50}$ değeri en yüksek (57,2 saat) bulunmuştur. Bu sonuçlardan formülasyondaki polimer konsantrasyonunun ve etkin

madde yükleme oranındaki artışın, mikroküre formülasyonlarından prednizolon asetatın % 50'sinin salımının gerçekleşmesi için gereken süreyi (t_{50}) artırdığı görülmektedir. Bu iki etkenin t_{50} değerleri üzerindeki etkileri istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur ($p<0,05$).

Hidrofilik polimerler kullanılarak hazırlanan mikroküre sistemleri sulu ortama konduklarında şişme eğilimindedirler. Bu özelliklerinden dolayı sulu ortamlarda bir jel difüzyon tabakası oluştururlar. Bu tabaka da etkin maddenin salımını geciktiren ve kontrol eden bir özellik gösterir. Yüksek konsantrasyonda polimer kullanılması ile sulu ortamda oluşan hidrojel tabakasında kalınlaşma meydana gelir ve bu da etkin maddenin difüzyonunu geciktirmektedir (109,174). Bu durumun yüksek konsantrasyonda kitosan kullanılarak geliştirilen formülasyonlarda salım süresinin uzamasının sebeplerinden biri olabileceği düşünülmektedir.

Orta molekül ağırlıklı kitosan polimeri ile hazırlanan formülasyonlarda aynı şartlar altında gerçekleştirilen in vitro salım deneyleri sonunda elde edilen t_{50} değerleri 13,8 saat ve 55,1 saat aralığında bulunmuştur. Benzer şekilde en düşük t_{50} değeri düşük polimer konsantrasyonu ve düşük etkin madde yükleme oranına sahip formülasyonda (CM0,5PA10) elde edilmiştir (13,8 saat).

En uzun prednizolon asetat salımı ise, (t_{50} değeri 55,1 saat) orta molekül ağırlıklı, % 1 polimer konsantrasyonu ve % 20 hedeflenen etkin madde yükleme oranının kullanıldığı formülasyonla (CM1PA20) elde edilmiştir. Bu formülasyondan 11 gün boyunca prednizolon asetat salımı gözlenmiştir. Bu mikroküre formülasyonu salım süresinin uzun olması nedeniyle stent formülasyonlarında kullanılmıştır.

Literatürde kitosan polimeri ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarından etkin madde salımının değerlendirilmesi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Desai ve Park (109) diyaliz temelli bir salım gerçekleştirirken, Ganza-Gonzales ve diğ. (116), Gavini ve diğ. (118) USP sepet yöntemini kullanmışlardır. Giunchedi ve diğ. (115), Huang ve diğ. (176), He ve diğ. (110) in vitro salım yöntemi olarak USP palet

yöntemini seçmişlerdir. Filipovic-Grcic ve diğ. (111) ve Cevher ve diğ.(119) ise tez çalışmalarımızda kullanılan yöntemi uygulamışlardır.

Bu yönteme göre Bölüm 3.2.5.6.1’de verildiği şekilde mikrokürelerin yerleştirildiği her Eppendorf tüpüne 1,25 mL salım ortamı konmuştur ve her bir örnek zamanında bu salım ortamı santrifüj sonrasında tamamen alınmış ve yeni salım ortamıyla değiştirilmiştir. Her bir nokta için altı örnek üzerinden elde edilen değerler zamana karşı % kümülatif salım grafiğine yerleştirilmiştir.

Kitosan polimeri tipinden, polimer konsantrasyonundan ve hedeflenen etkin madde yükleme oranından bağımsız olarak bütün mikrokürelerden % 100 oranında kümülatif prednizolon asetat salımı gözlenmiştir.

Kitosan kürelerinden prednizolon asetatın in vitro salım kinetiklerinin belirlenmesi için 0.derece, Higuchi, ve Hixon-Crowell kinetik modelleri uygulanmıştır. İstatistiksel inceleme sonucunda kitosan mikrokürelerinden salınan prednizolon asetatın salım kinetiğinin Higuchi kinetiğine uyduğu görülmektedir. En yüksek R^2 değeri bu model için elde edilmiştir. Kitosan mikrokürelerinden etkin madde salımının uyduğu Higuchi kinetiği matriksten ilaç salımını öngören bir kinetiktir (8). Matriks tipi sistemlerde etkin madde polimer yapısı içinde hapsolmuş durumdadır. İn vitro salım çalışmalarında mikrokürelerin salım ortamıyla teması sonucunda, öncelikle mikrokürelerin yüzeyinde ve yüzeye yakın porlarındaki etkin madde salınmakta bu yüzden bir patlama etkisi görülmektedir. Sonrasında ise polimer içine gömülü olan etkin maddenin dışarı çıkışı ve ortama salınması gözlenmektedir. Etkin maddemizin mikrokürelerden salımının Higuchi kinetiğine uyması, salımın daha çok difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (109,116). Bunun sebebinin mikrokürelerin sulu ortamda şişmeleri ve matriks yapıları oluşturmaları olabileceği düşünülmüştür (109,110,116).

5.6. Biyoparçalanır PLGA Stentlerinin Hazırlanması

5.6.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmaları; stentlerin yapısını oluşturan polimer tipinin seçimi, üretim yöntemi, şekilleri ve formülasyon parametreleri açısından tartışılmıştır. Bu amaçla seçilen üretim yöntemi, formülasyon parametreleri olan biyoparçalanır polimer tipinin seçimi, konsantrasyonunun tayini ve yardımcı maddelerin tespitine yönelik çalışmalarla uygun parametrelere karar verilmiş ve çalışmalarımızda kullanılan biyoparçalanır stent formülasyonları elde edilmiştir.

Biyoparçalanır stent yapılarının hazırlanması için PLGA polimerinin (75:25) ve (50:50) tipi olmak üzere iki farklı polimer kullanılmıştır. PLGA polimerinin FDA onaylı, biyoparçalanır, mekanik olarak dayanıklı, vücut içinde parçalanma süresi kopolimer oranları ile kontrol edilebilen özellikleri nedeniyle biyoparçalanır stentlerin hazırlanmasında bu polimerler kullanılmıştır.

PLGA kopolimerinin içerdiği monomerlerden PLA oranındaki artış, kopolimerin hidrofobik, düşük su absorplama ve şişme özelliğine sahip ve biyolojik ortamda parçalanma süresinin uzun olmasına yol açmaktadır. PGA ise kopolimerin yapısında yer alan hidrofilik monomerdir ve PGA oranında yapılacak artış ile çabuk parçalanan, su absorplama yüzdesi ve suda çözünürlüğü yüksek olan kopolimerler elde edilmektedir (1,24,76).

Biyoparçalanır bir stentin damar içinde elastik geri büzülme ve olumsuz geri şekillenmeyi engelleyecek bir süre (en az 2 ay) yapısını bozmadan kalması gerektiğinin bildirilmesi nedeniyle tez çalışmamızda biyoparçalanır stentlerin hazırlanmasında PLGA polimer olarak seçilmiştir (76,91). Literatürde yer alan çalışmalar da dikkate alınarak, biyoparçalanma süresi ve mekanik özellikleri bakımından yeterli süre yapısını koruyabileceği ve istenen amaca ulaşmayı sağlayabileceği düşüncesiyle PLGA (75:25, M.A 136.000) ve daha hidrofilik tipi olan PLGA (50:50, M.A 34.000) çalışmalarımız kapsamına alınmıştır.

PLA kullanılarak hazırlanan stentlerin biyoparçalanma sürelerinin çok uzun oluşu ve ilaç salımının istenenden daha uzun sürmesine yol açabileceği düşünüldüğünden kullanılmaktan vazgeçilmiştir. Bununla beraber literatürde belirtildiği şekilde, yapıda % 50 oranından daha fazla PGA bulunması ise yapının suda çözünürlüğünü ve biyoparçalanma süresini hızlandırmakta ayrıca biyoparçalanır stent yapılarının damar içinde yeterli fiziksel dayanıklılık göstermemelerine ve sonuçta restenozu engellemekte yetersiz kalacaklarına işaret edilmektedir (76, 88,95,153).

Literatürde yer alan biyoparçalanır stent üretim yöntemlerine bakıldığında, lazer ile kesme yöntemi ile (31) üretilen Igaki-Tamai stenti dışındaki biyoparçalanır stentlerin polimer filmi (36,88,90,154-156) ya da polimerik ipliklerden (92) hareketle üretildikleri görülmektedir. Öncelikli olarak biyoparçalanır polimerin organik bir çözücüde çözündürülmesi ve hazırlanan polimer çözeltilerinin pürüzsüz bir yüzeye dökülerek (solution-casting yöntemi) çözücünün buharlaşmasını takiben polimer filmi oluşturulması ve bu filme amaçlanan stent şeklinin verilmesi tez çalışmalarımızda kullanılacak olan biyoparçalanır stent üretim yöntemi olarak seçilmiştir.

Çözelti-dökme (solution-casting) yöntemi ile hazırlanan filmlerin özellikleri üzerinde esas olarak etkili üretim işlemi basamağı çözücünün ortamdan uzaklaşma şeklidir. Uygun polimer ve plastizer konsantrasyonları belirlenerek hazırlanan polimer çözeltileri, alüminyum folyo ile kaplı lamaların yüzeylerine döküldükten sonra farklı çözücü uzaklaştırma yöntemleri denenmiş ve optimum yöntem araştırılmıştır. Bu amaçla polimer çözeltisi yayılan lamlardan bir grup 40°C'lik etüvde diğer bir grup da oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her iki yöntemde de diklorometan polimer çözeltisinden uzaklaşırken, kaynama noktasının düşüklüğüne bağlı olarak hızla buharlaşmıştır. Bu durum da polimer filmlerinde hava baloncukları oluşmasına yol açmıştır (Şekil 4.25). Baloncuk oluşumundan kaçınılması için diklorometanın yavaş ve kontrollü olarak ortamdan uzaklaşması gerektiği farkedilmiş ve polimer çözeltisi yayılan lamalar öncelikle buzdolabında 24 saat

tutulmuşlardır. Sonrasında diklorometanın tam olarak uzaklaşması için filmler 40 °C'lik etüvde kurutulmuşlardır. Bu şekilde filmlerde baloncuk oluşumu engellenmiştir. Literatürde benzer üretim yöntemi basamakları içeren çalışmalar yer almaktadır (160,161).

Ön formülasyon çalışmalarında son olarak hazırlanacak olan biyoparçalanır stentlerin şekillerine karar verilmiştir. Bu amaçla literatürde yer alan bir çok farklı stent şekli içinden; filmlere kolayca şekil verilebilmesi ve yüzeyinin geniş oluşu ve bu özelliği nedeniyle damar duvarına gerekli mekanik desteği yeterince sağlayabilecek olması sebeplerinden dolayı helikal yapıdaki stent şekli seçilmiştir. Literatürde polimer filmlerinden hareketle hazırlanan helikal yapıdaki biyoparçalanır stentleri ile ilgili benzer çalışmalar bulunmaktadır (65,90,154)

Ön formülasyon çalışmalarında, üretim yöntemi ve polimerlerin seçiminden sonra hazırlanacak olan formülasyonlar parametreleri tayin edilerek sonuç formülasyona karar verilmiştir. Seçilen iki farklı tipte PLGA (75:25 ve 50:50) polimer çözeltilerinin konsantrasyonunun belirlenmesi için farklı oranlarda polimer, çözücü olarak kullanılan diklorometan içinde çözündürülmüş ve farklı yoğunluktaki çözeltilerden elde edilen filmler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. % 5 ve % 10 (a/h) oranında polimer kullanılarak hazırlanan filmler ince ve kırılgan yapı oluşturmuşlar ve istenen mekanik özellikleri gösterememişlerdir. % 30 ve % 50 oranında polimer içeren çözeltiler ise diklorometanın uzaklaşmasını takiben sert ve şekil verilmesi zor, ayrıca kolayca kırılan filmler oluşturmuşlardır. % 25 (a/h) oranında PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) içeren polimer çözeltilerinden hareketle hazırlanan filmler kalınlık (~ 100 µm) ve kolay şekil verilebilme özelliklerinden dolayı formülasyonların geliştirilmesi için bu konsantrasyonda çalışılmasına karar verilmiştir.

Polimer filmlerine esneklik verilmesi için plastizer kullanımı literatürde bazı çalışmalarda bildirilmektedir (76,158,159). Uygun plastizer kullanımı ile polimer filmlerinin dayanıklılığı değiştirilmeden kırılganlık özelliklerinin önüne geçilmektedir. Böylece aşırı zorlamaya maruz kalan yapılar kırılmak yerine bükülmektedirler. Damar içinde daralmayı engelleyecek bir mekanik dayanıklılığa

sahip olacağı düşünölen yapılar, uygulanan zorlamaya dayanabilmekte fakat belli bir güç uygulanmasını takiben yapı kırılmaktadır. Zorlamalara bağılı olarak yapının kırılmadan gerekli direnci göstermesi gerekmektedir. Polimerik stentlerde meydana gelebilecek kırılmalar, emboli ve trombus oluşumu riskini doğurabilmektedir.

Her iki tipte PLGA kullanılarak hazırlanan % 25 (a/h) konsantrasyonunda polimer çözeltilerinden hareketle elde edilen filmlerde, mekanik olarak dayanıklı, kolay şekil verilebilen, istenen kalınlıkta fakat esnek olmayan bir yapı gözlenmiştir. Bu nedenle literatürde bu amaçla kullanılan plastizerler içinden PEG 4000, diklorometanda çözünebilmesi ve düşük oranlarda etkili esneklik sağlaması açısından uygun plastizer olarak seçilmiştir (158). Plastizer oranı belirlenirken % 0,1, 0,5, 1 ve 2 (a/h) oranlarında plastizer % 25 oranında PLGA içeren polimer çözeltilerine karıştırılmıştır. Çözeltilerin pürüzsüz bir yüzey olarak kullanılan alüminyum folyo ile kaplanmış lamlara dökölmesi ve çözücünün uzaklaşmasından sonra elde edilen filmler incelenmiş ve uygun plastizer oranı olarak % 0,5 seçilmiştir. % 1 ve 2 oranında plastizer içeren filmler dayanıklılıklarını kaybetmiş ve çok esnek yapılar oluşturmuş, % 0,1 oranında PEG 4000 içeren filmler de ise yeterli esneklik sağlanamamış ve filmlere şekil verilmeye çalışırken kırılmalar gözlenmiştir.

Etkin madde olarak seçilen prednizolon asetat, tez çalışmamız kapsamında model ilaç olarak seçilmiştir. Restenozun engellenmesi için ilaç salan stent yapılarında kullanılabilecek ilaçların restenozda rol oynayan hücresel mekanizmaları bir ya da birden fazla yoldan etkileyerek inhibe etmesi, hücrelere geçişinin yüksek oranda olması, düşük konsantrasyonlarda yüksek etkinlik göstermesi ve sistemik dolaşıma geçmesi durumunda düşük yan etki ve toksisite göstermesi beklenir (11,49,60). Antiinflatuvar özellik gösteren etkin maddeler de bu gruplar içinde yer almaktadır. Steroid yapıdaki antiinflatuvar ilaçların, stent yerleştirilmesi sonucu damar duvarında oluşan yaralanmaya karşı verilen iyileşme cevabında, inflamasyonu inhibe etmesi ve bu sayede hücre proliferasyonunu engellemesi restenozu engelleme mekanizmalarıdır (73). Prednizolon asetat, antiinflatuvar etkili steroid yapıli sentetik bir glukokortikoittir (123,138) ve çalışmamızda bu özelliklerinden dolayı model ilaç olarak seçilmiştir.

Restenozun engellenmesi için biyoparçalanır stentlerden ilaç salımının süresi önemli bir rol oynamaktadır. Klinik olarak restenoz mekanizmalarının aktif olduğu operasyonu takip eden ilk 2 – 3 ay süresince etkin maddenin kontrollü olarak salımının devam etmesi istenmektedir (31). Sadece prednizolon asetat içeren stentlere ek olarak salım süresinin uzatılması için prednizolon asetat içeren mikrokürelerin de polimer çözeltileri içinde disperse edilmesi ve mikroküre içeren biyoparçalanır stent yapılarının geliştirilmesine karar verilmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalarda Zhang ve diğ. (164) poli(gliserol-ε-kaprolakton) mikrokürelerini, poli(N-izopropilakrilamid) hidrojel yapısı içinde disperse etmişlerdir. Araştırmacılar etkin maddenin direkt olarak hidrojel içinde disperse edilmesi sonucunda salımının hızlı olduğunu (ilk gün % 90'ın üzerinde salım) bununla beraber etkin madde içeren mikrokürelerin yapıya karıştırılmasıyla salımın belirgin ölçüde uzadığını (55 günün sonunda % 55'lik kümülatif salım) bildirmişlerdir.

Norton ve diğ. (177) ise deksametazonu ve deksametazon içeren PLGA mikrokürelerini hidrojel yapıları içinde disperse ederek, hidrojelden ve mikrokürelerin karıştırıldığı hidrojellerden etkin madde salımını karşılaştırmalı olarak incelemişler ve mikroküre içeren hidrojel sisteminin uzun süre kontrollü olarak etkin madde salımını sağladığını gözlemlemişlerdir.

Blanco ve diğ. (178), sitarabin içeren kitosan mikroküreleri üretmişler ve bu mikroküreleri PLGA filmi içinde disperse ederek salım özelliklerini incelemişlerdir. Mikrokürelerden etkin maddenin tamamı 48 saatte salınırken, etkin madde içeren kitosan mikroküreleri karıştırılmış PLGA filmlerinden salım 94,5 saatte % 80 olarak bulunmuştur.

Bu örnekler incelendiğinde mikrokürelerin üretildiği polimerler ile matriks olarak kullanılan polimerlerin birbirleri içinde çözünmeyen yapılar olduğu dikkat çekmektedir. Böylece sistemin içinde yer alan mikroküreler yapılarını

koruyabilmişlerdir. Benzer şekilde tez çalışmamızda, etkin madde ve etkin madde içeren mikrokürelerin disperse edildiği biyoparçalanır stentler hazırlanmıştır.

5.6.2. Stentlerin Hazırlanmasında Kullanılan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) Polimer Filmlerinin Hazırlanması

Polimer filmlerinin üretilmesi için Bölüm 3.2.6.2’de verilen üretim yöntemi kullanılmıştır. PLGA polimerleri tamamen çözündükten sonra gerekli miktardaki PEG 4000 eklenmiştir ve kolayca çözünmüştür.

Literatürde polimer çözeltilerinin dökülmesi için kullanılabilecek yüzeyler arasında cam, teflon, alüminyum ve paslanmaz çelik yüzeyler yer almaktadır. Bu yüzeyler arasından polimer filminin yapışmamasını, kolayca yüzeyden ayrılabilmesini ve polimer çözeltisinin kolayca üzerinde yayılabilmesini sağlayan alüminyum seçilmiştir. Bu lamların yüzeyinde 500 µL polimer çözeltisinin dökülmesi için 2x3 cm’lik bir alan çizilmiştir. Polimer çözeltisinin dökme işlemi sırasında mikropipet kullanılmıştır. Bu sayede belirlenen alanın dışına taşılmamış ve polimer çözeltisi homojen olarak yayılmıştır. 500 µL’nin altında çözelti kullanımı ise çok ince ve kırılkan yapıda filmler oluşturmuştur.

Alüminyum folyo üzerine dökülmüş olan polimer çözeltilerinden diklorometanın uzaklaşması için lamlar buzdolabında düz bir zemin üzerine yerleştirilmiş ve 24 saat bekletilmişlerdir. Bu sayede diklorometan kontrollü ve yavaş olarak polimer çözeltisinden uzaklaşmış ve balon oluşumu gözlenmemiştir. Literatürde de diklorometanın kontrollü uzaklaşması için buzdolabında bekletildiği örnekler yer almaktadır (157,160,161). Kuruyan filmlerden şeritler kesilerek stentlerin hazırlanacağı filmlerle aynı özelliklerde polimer şeritleri elde edilmiştir.

5.6.3. Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması

Literatürde biyoparçalanır stentlerle yapılan çalışmalarda helikal stent yapıları sıkça kullanılmıştır (65,90,154,159). Tez çalışmamızda bu stent yapısının

oluşturulması için Bölüm 3.2.6.2’de verilen yöntem ile üretilen polimer filmleri kullanılmıştır. Filmlerin hazırlanmasında kullanılan yöntemden farklı olarak lam üzerine dökülen polimer filmleri buzdolabında 1 saat tutulmuş sonrasında bu polimer tabakalarından şeritler kesilmiştir. Filmlerin bir saat buzdolabında tutulma sebebi, bu sürenin sonunda kolayca şekil verilebilecek sertliğe erişmiş olmalarıdır. Filmler buzdolabında 1 saatten fazla tutulurlarsa diklorometanın uzaklaşmasına bağlı olarak sertleşmekte ve şekil verilemeyecek bir yapı almaktadır. 1 saatten daha az buzdolabında tutulan polimer çözeltileri ise kurumanın yetersizliğine bağlı olarak film yapısı oluşturmamakta ve şeritler halinde kesilip şekil verilmeleri mümkün olmamaktadır.

Bir saat süresince buzdolabında tutulduktan sonra 0,3x3 cm’lik şeritler halinde kesilen filmler, pirinçten yapılmış 3 mm çapındaki silindirik çubuklara kolayca sarılmakta ve sarıldıkları şekli korumaktadır ve stent yapılarının uzunluğu klinikte sıklıkla kullanılan stent uzunluğuna benzer olarak 1,5 cm olmaktadır.

5.6.4. Etkin Madde ve Mikroküre İçeren Biyoparçalanır Stentlerin Hazırlanması

Suda pratik olarak çözünmeyen prednizolon asetat, diklorometan ile hazırlanan polimer çözeltileri içerisinde homojen olarak dağılmıştır. Biyoparçalanır ilaç salan stentlerin üretiminde Bölüm 3.2.6.3’de verilen yöntem kullanılmıştır. Prednizolon asetatın polimer filmlerinin yapısına girmesi, filmlerin ve filmler kullanılarak hazırlanan stentlerin yapısında etkin maddenin agrege olması, polimerik yapıların kırılabilirliğinin artması gibi fiziksel sorunlar oluşturmamıştır.

Etkin madde stent başına 1 mg olacak şekilde hesaplanmış ve stent formülasyonlarına eklenmiştir. Antiinflamatuvar etkinin görülebilmesi için seçilen bu miktarın yeterli olduğu düşünülmektedir (138). Miktar tayini yöntemi olarak kullanılan UV spektroskopisi yönteminde tayin edilebilirliği artırmak için 1 mg’dan düşük dozlarla çalışılmamıştır.

Stent formülasyonlarında disperse edilen mikroküre formülasyonu seçilirken amaç etkin maddenin salımını uzatmak ve kontrol altına almak olduğundan en uzun in vitro salım gösteren, üretim verimi ve etkin madde içeriği yüksek olan kitosan mikroküre formülasyonu biyoparçalanır stentlerin yapısına girmiştir. Tez çalışmalarımız kapsamında stent formülasyonlarında yer alan mikroküreler % 1 (a/h) oranında orta molekül ağırlıklı kitosan ve % 20 (a/a) oranında prednizolon asetat içeren (CM1PA20 kodlu formülasyon) formülasyondur. Bu mikroküre formülasyonunun partikül büyüklüğü de istenen aralıktadır (10,4 μ m). Uygun partikül büyüklüğünde kitosan mikrokürelerinin yapıya girmesi, stentlere helikal şekil verilmesinde olumsuz bir etki yaratmamıştır. Hazırlanan filmlerin ve stentlerin mekanik özellikleri kitosan mikrokürelerinden etkilenmemiştir.

5.7. Hazırlanan Biyoparçalanır Stentlerin Karakterizasyonu

5.7.1. Polimer Filmlerinin Şişme ve Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi

Biyoparçalanır stent formülasyonlarında kullanılan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) kopolimeri tiplerine bağlı olarak elde edilen filmlerin ve stentlerin su absorplama özellikleri de farklı olmaktadır. Biyoparçalanır stentlerin üretilmesi için hazırlanan film şeritleri, içinde 10 mL salım ortamı bulunan flakonlara konmuş ve 37 °C’de inkübe edilmişlerdir.

Polimer filmleri üretildikleri kopolimerin tipine bağlı olarak farklı oranlarda su absorbe etmişlerdir. PLGA (75:25) kopolimeri, kullanılan PLGA (50:50) tipine göre daha hidrofobik yapıda bir polimerdir (76,153). İlk 48 saatin sonunda başlangıç ağırlığının % 26,7’si kadar su absorplamış ve altıncı günün sonuna kadar ağırlık artışı gözlenmeye devam etmiştir. Altıncı günden sonra polimer filmlerinin su absorplama özellikleri doygunluğa ulaşmış ve onbeşinci günün sonuna kadar (15. gün sonunda %73,6) dengede kalmıştır (Şekil 4.24). Bulunan sonuçlar literatürde PLGA (75:25) polimeri kullanılarak yapılan çalışmalar ile uyum içindedir (25).

PLGA (50:50) polimeri ise tez çalışmalarımızda kullandığımız diğer PLGA tipine göre daha hidrofiliktir ve buna bağlı olarak su absorplama özelliği daha fazla bulunmuştur. PLGA (50:50) polimeri kullanılarak üretilen filmler 48 saatin sonunda % 32,2 oranında su absorplamıştır. Dördüncü günden itibaren ağırlık artışında bir farklılık gözlenmemesi, polimerin su absorplama özelliği bakımından doygunluğa ulaştığını göstermektedir. Onbeş günün sonunda su absorplama yüzdesi % 81,9 bulunmuştur. PLGA (50:50) polimeri için su absorplama yüzdeleri, PLGA (75:25) polimerine göre her nokta için istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır ve aradaki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuç PLGA (50:50)'nin hidrofilik yapısına bağlanabilir (76,153).

5.7.2. Hazırlanan Polimer Filmlerinin ve Stentlerin Kalınlık Kontrolü

Biyoparçalanır stent yapılarının hazırlanması için üretilen polimer filmlerinin kalınlıkları, kompas yardımıyla ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, PLGA (75:25) filmlerinin ortalama kalınlıkları $136 \pm 5 \mu\text{m}$ ve PLGA (50:50) filmlerinin ortalama kalınlığı ise $109 \pm 8 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. Bu polimer filmleri kullanılarak hazırlanan biyoparçalanır stentlerin iç çapları 3 mm, uzunlukları ise 1,5 cm'dir.

Literatürde biyoparçalanır stentlerde kullanılan polimer filmlerinin kalınlıklarının değerlendirildiği çalışmalarda $100 \mu\text{m}$ kalınlığın altındaki polimer filmlerinin restenozun önlenmesi için yeterli mekanik destek görevi göremediği belirtilmiştir. Bununla birlikte $200 \mu\text{m}$ 'den daha kalın filmler kullanılması hazırlanan stentlerin esnekliklerini kaybetmesine yol açmaktadır (76).

Bu nedenle çalışmamızda stentlerin üretiminde kullanılan polimer filmleri bu değerler dikkate alınarak uygun kalınlıkta ($\sim 100 \mu\text{m}$) hazırlanmıştır.

5.7.3. Hazırlanan Stent Formülasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Biyoparçalanır stent yapılarının hazırlanması için üretilen polimer filmlerinin yüzey özellikleri SEM ile genel yapıları ise dijital fotoğraf makinası kullanılarak her iki tip (PLGA 75:25 ve PLGA 50:50) polimerik stent yapısı için ayrı ayrı incelenmiştir.

Etkin madde içermeyen PLGA (75:25) stentlerinin genel yapıları incelendiğinde (Şekil 4.27A-B), üretim yönteminde kurutma aşamasında polimer filmleri önce buzdolabında bir saat bekletilmiş takiben etüvde (40°C) tutularak diklorometanın kontrollü olarak uçurulması sağlanmış olmakla birlikte, sıklıkla karşılaşılan bir sorun olan hava kabarcığı oluşumu gözlenmiştir. Buna rağmen prednizolon asetat ya da prednizolon asetat içeren mikroküre formülasyonlarının polimer yapısı içinde disperse edilmesi ile oluşturulan stent formülasyonlarında ise hava kabarcığı oluşumu görülmemiştir. Bu şekilde gözlenen hava kabarcığı oluşumu sorunu literatürde benzer şekilde aşamalı çözücü uçurma işlemleri kullanılarak engellenmeye çalışılmıştır (157,160,161).

Etkin maddenin ve etkin madde yüklü kitosan mikroküre formülasyonlarının polimer filmlerinin morfolojisi üzerindeki etkileri ayrıca incelenmiştir. PLGA (75:25) polimer filmleri içinde etkin madde lokalize olmuş ve yüzeyde etkin madde ya da mikroküre lokalizasyonu gözlenmemiştir. Etkin madde ya da kitosan mikrokürelerinin polimer matriksi içinde aglomerasyonuna rastlanmamış, etkin madde ve mikrokürelerin mikro düzeyde dispersiyonunun homojen olduğu görülmüştür. PLGA (75:25) stentlerinin kesitleri alınmış ve SEM ile incelenmiştir. Etkin maddenin polimer matriksi içinde homojen olarak dağıldığı kesit fotoğraflarından da görülmektedir. İlaç ve polimer fazları arasında fiziksel bir geçimsizlik ya da ilacın faz ayrımı görülmemiştir. Stent yapılarının yüzeyleri incelendiğinde etkin madde ya da mikroküre bulunmayan, pürüzsüz, gözeneksiz, çatlama ve yarıkların bulunmadığı yüzey özellikleri gösterdikleri de izlenmiştir.

PLGA 50:50 kopolimeri kullanılarak hazırlanan ve etkin madde içermeyen stent yapılarının genel şekilleri ve fotoğrafları ilgili bölümde verilmiştir (Şekil 4.28A-B). Fotoğraflarda görüleceği üzere etkin madde içermeyen filmler kullanılarak hazırlanan stentler hava kabarcığı içermeyen, pürüzsüz ve şeffaf yapıdadırlar. Prednizolon asetat ve prednizolon asetat içeren kitosan mikrokürelerinin PLGA (50:50) matriksi içinde disperse edilmesiyle birlikte şeffaf yapı yerini beyaz ve opak bir yapıya bırakmıştır. Ayrıca, etkin madde ve mikrokürenin yapı içinde disperse edilmesi hava kabarcıkları oluşumuna yol açmamıştır.

Etkin madde ve mikroküre, PLGA (50:50) polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan polimer filmleri içinde homojen olarak disperse edilmiş ve yüzeyde lokalize olmamıştır. PLGA (50:50) stentlerinden kesit alarak incelendiğinde, prednizolon asetat yüklü mikroküreler içeren stentlerin iç yapısında mikrokürelerin disperse olmasından kaynaklandığı düşünülen gözenekli bir yapı oluşumu tespit edilmiştir (Şekil 4.33).

PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerleriyle hazırlanan prednizolon asetat ve prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren stent yapılarının yüzeyleri pürüzsüzdür ve ilaç ya da mikroküre lokalizasyonu görülmemektedir. Ayrıca helikal yapıların kenarları düzgün yapıdadır ve girinti çıkıntı göstermemektedir. Restenoza yol açan mekanizmalar arasında stentin kenarlarının damar duvarında yarattığı yaralanma etkisi önemli bir rol oynadığından, üretilen biyoparçalanır stentlerin kenarlarının pürüzsüz ve düzgün bir yapıda oluşu yaralanma ve buna bağlı inflamasyon cevabı önleyeceği öngörülmüştür (65). Helikal yapıdaki stentlerin damar duvarı ile temas edecek yüzeylerinin genişliği elastik geri büzülmeye karşı etkili bir mekanik destek oluşturulmasını ve etkin maddenin lokal olarak daha etkin salınmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

5.7.4. Biyoparçalanır Stentlerden Prednizolon Asetatın İn Vitro Salım Çalışması

Biyoparçalanır polimerler kullanılarak hazırlanmış olan stentlerin formülasyon ve üretim parametreleri optimize edildikten ve üretilen yapılar üzerinde gerekli karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra farklı polimer yapılarının etkin maddenin in vitro ortamda salımı üzerine etkileri incelenmiştir. Biyoparçalanır stent yapısına girecek olan etkin madde içeren mikroküre formülasyonu (CM1PA20), % 1 (a/h) oranında orta molekül ağırlıklı kitosan polimeri ve polimerin ağırlıkça % 20'si oranında prednizolon asetat içermektedir.

Literatürde, tez çalışmamızda kullanmış olduğumuz in vitro salım yöntemiyle uyum içinde olan yöntemler ilaç salan stentlerden etkin madde salımının değerlendirilmesi için kullanılmıştır (50,76,77,169). Belirlenen zaman aralıklarında Eppendorf tüplerindeki bütün salım ortamı alınmış ve yerine aynı miktarda taze salım ortamı eklenerek, suda çözünürlüğü çok düşük olan prednizolon asetat için sink koşullar yerine getirilmiştir.

Prednizolon asetatın in vitro ortamda salım profillerine bakıldığında, PLGA (75:25) ile hazırlanan biyoparçalanır stentlerden ikinci ayın sonunda (63. gün) % 5,02 oranında kümülatif etkin madde salımı görülürken, PLGA (50:50) biyoparçalanır stentlerinde ikinci ayın sonunda elde edilen etkin maddenin kümülatif salımı % 62'dir. Her iki formülasyon da ilk 3 gün içinde yüzeye yakın bölgelerde bulunan prednizolon asetatın hızlı salımı dolayısı ile patlama etkisi göstermiştir. PLGA (75:25) için patlama etkisini takiben kontrollü ve yavaş etkin madde salımının gözlemlendiği ikinci bir salım fazı tespit edilmiştir. Polimerin su absorplama özelliğinin dengeye gelmesinden itibaren salımda artış görülmüş ve etkin maddenin 3 ay sonunda yaklaşık %10'u salınmıştır (Şekil 4.34).

PLGA (50:50)'nin hidrofilik yapısına bağlı olarak hızlı su absorplama özelliği göstermesi ve kolay parçalanması, içerdiği prednizolon asetatı hızlı

salmasına yol açmıştır. PLGA (50:50) stenti, kolay parçalanan yapısı dolayısı ile kırkinci günden itibaren helikal yapısını kaybetmiştir (Şekil 4.36).

Prednizolon asetat yüklü kitosan mikroküreleri içeren PLGA (75:25) stentinde, ikinci ayın sonunda (63. gün) salınan etkin maddenin kümülatif miktarı % 9,9'dur. Beklenenin aksine, sadece etkin madde içeren PLGA (75:25) stenti ile karşılaştırıldığında, etkin maddenin salımı daha hızlı olmuştur. Bu durumda yapıda bulunan ve hidrofilik bir polimer olan kitosanın su absorplama özelliğinin etkin maddenin salımını hızlandırmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, mikrokürelerin polimer matriksi içine su girişini hızlandırmış olabilecekleri düşünülmektedir.

PLGA (50:50) polimeri ile etkin madde yüklü mikroküreler içeren stent yapılarında ise ikinci ayın sonunda (63. gün) % 12,9 oranında kümülatif etkin madde salımı gözlenmiştir. Mikroküreler, sadece etkin madde içeren yapıya göre salım hızını yavaşlatmış ve patlama etkisinin önüne geçmiştir. Böylece etkin maddenin daha uzun bir süre kontrollü olarak salınmasını sağlamıştır. Bu sonuca ek olarak mikroküre içeren PLGA (50:50) stentleri helikal yapılarını takibin kesildiği 63. güne kadar korumuşlardır.

İn vitro ortamda elde edilen salım sonuçlarının kinetik modellerden 0.derece, Higuchi ve Hixon-Crowell kinetikleri salım sonuçlarına uygulanmış ve en yüksek R^2 değeri Higuchi kinetiği ile elde edilmiştir. Her iki PLGA tipi için de in vitro salımın Higuchi kinetiğine uyduğu gösterilmiştir. Matriks sistemlerinden salımı öngören bu modelde etkin madde polimer matriksi içinde gömülü ve dağılmış durumdadır. Zamanla birlikte etkin maddenin matriks yapısı içinden salımı gerçekleşmektedir. Biyoparçalanır stentlerde görülen etkin madde salım grafikleri incelendiğinde, stent formülasyonlarında prednizolon asetat salımının ilk 3 gün içinde patlama etkisi göstermesinin, stentlerin yüzeyine yakın bölgelerde kalan etkin maddeye bağlı olabileceği düşünülmektedir. İkinci bir salım fazı olarak görülen yavaş ve uzun süreli salımın ise PLGA matriks yapısı içinde homojen bir şekilde dağılmış olan prednizolon asetatın polimer matriksinden salım ortamına geçişinin difüzyon kontrollü olarak gerçekleşmesine bağlabileceği öngörülmüştür. Polimerin in vitro

salım ortamında degradasyonu arttıkça, parçalanan polimer matriksinden etkin maddenin salımı da hızlanmıştır (25,158).

5.8. Etkin Madde İçeren Kaplı Stent Formülasyonlarının Hazırlanması

5.8.1. Metalik Stentlerin Biyoparçalanır Polimerlerle Kaplanması

Metalik stentlerin ilaç içeren biyoparçalanır polimerler ile kaplanmaları sonucunda kontrollü etkin madde salımı sağlayan ve restenoz oluşumunu engelleyen ilaç salan stent yapıları literatürde son yıllarda önem kazanmıştır (26).

Metalik stentlerin biyoparçalanır polimerler ile kaplanmaları için kullanılan farklı yöntemler içinden (21,73,79,80,167) Jayaraman ve diğ.'in (166) kullandığı yöntem tez çalışmalarımız kapsamında hazırlanan polimer kaplı ilaç salan stentlerin üretiminde kullanılmıştır. Polimerle kaplama amacıyla kullanılacak formülasyon, biyoparçalanır stentlerin üretiminde kullanılan polimer formülasyonu ile aynıdır. Formülasyonun değiştirilmemesi, formülasyon kaynaklı etkenlerin kaplama karakterizasyonu ve in vitro salım üzerindeki etkilerinin sabit olmasını sağlamıştır.

Kaplama işlemleri sırasında, polimer çözeltisinin stentin sadece damar ile temas halinde olması, dış yüzeyinde yer alması istenen bir durumdur (166). Böylece kan ile temas halinde olan stentin iç yüzeyinden direkt kan dolaşımına etkin madde geçişi önlenmiş olmakta, sistemik etki ve toksisite riskinden de kaçınılmaktadır (50). Literatürde sıklıkla kullanılmış olan daldırarak kaplama yönteminde (dipping) polimer çözeltisi stentin iç yüzeyine de tutunmakta ve bunun sonucunda etkin madde salımının stentin iç yüzeyinden de gerçekleşmesinin önüne geçilememektedir.

Bu bilgiler gözönüne alındığında, kaplama yapılacak olan metalik stentlerin iç çeperinde etkin maddenin kalmasını mümkün olduğunca engelleyecek olan ve literatürde benzer örnekleri yer alan bir kaplama yöntemi (166) kullanılmıştır. Bu yöntem kullanılarak stent yapısının içinde polimer kalıntılarının kalma olasılığı engellenmiştir. Stentin iç yüzeyinde polimer kalıntısının olmaması, damara

yerleştirildiğinde stent içinden geçen kan akışını azaltmayacak, ayrıca iç yüzeydeki polimerin parçalanarak emboli riski oluşturmasını da engelleyecektir (11,34,50,70). Bu üstünlüklere ilave olarak stentin iç yüzeyinde ilaç içeren polimerik tabakanın bulunmaması sistemik kan dolaşımına etkin madde salımını da engelleyecektir.

Etkin maddenin ya da mikrokürelerin yapıya dahil olması, kaplama işleminin uygulanabilirliğini kısıtlamamıştır. Polimer çözeltisinin içinde disperse edilen etkin madde ya da mikroküreler kaplamanın fiziksel dayanıklılığını, esnekliğini ve diklorometanın kaplama çözeltisinden uzaklaşmasını olumsuz bir yönde etkilememiştir.

Literatürde restenozun önlenmesi için geliştirilen polimer kaplı ilaç salan stent yapıları yer almaktadır. Lincoff ve diğ. (73), restenozun engellenmesi amacıyla geliştirdikleri ilaç salan stent yapısında, metalik stenti kaplamak için PLA polimer kullanmışlardır. Etkin madde olarak antiinflamatuvar etkili glukokortikoid yapılı bir steroid olan deksametazon kullanılmıştır. PLA polimeri ile püskürterek kaplama yapılmış ve kaplamanın başarı ile uygulanabildiği, kontrollü ilaç salımını sağladığı gösterilmiştir.

Finkelstein ve diğ. (79) farklı PLGA tipleri kullanarak metalik stentler üzerinde kaplama yapmışlardır. Araştırmacılar, PLGA polimer kaplamasını stent yüzeyine başarıyla uygulamışlar ve kaplamanın gerekli fiziksel özellikleri sağladığını ve içerdiği etkin maddeyi kontrollü olarak saldıgını belirtmişlerdir.

5.8.2. İlaç Kaplı Stent Formülasyonlarının Karakterizasyonu

5.8.2.1. Kaplı Stentlerin Açılma Kontrolü

Kaplama yapılan stentlerin SEM fotoğraflarından da görüleceği üzere % 25 (a/h) konsantrasyonunda PLGA içeren çözeltiler kullanılarak yapılan kaplama işlemi, stent kapalı durumdayken gerçekleştirilmiştir. Kaplama amaçlı kullanılan polimer tabakası stentin metal kenarları arasındaki boşlukları örtmektedir. Kaplama yapılan

stentler, anjioplasti balonunu şişirmek için kullanılan ve üzerinde uygulanan basıncın okunabildiği bir gösterge bulunan cihaz yardımıyla balonunun şişirilmesi ile açılmışlardır. Kontrol amacıyla kaplama yapılmamış metalik stentler de aynı cihaz ve anjioplasti balonuyla açılmışlardır. Metalik stentler ve kaplama yapılan stentlerin aynı basınç (8 bar) uygulandığında aynı oranda açılmaları, stentin etrafını saran polimer kaplamasının stentin açılması için mekanik bir engel yaratmadığını düşündürmektedir. Kaplamanın stentin yüzeyini örten yapısında ise açılma sırasında bazı bölgelerde gözlenen yırtılmaların, polimerin yüksek konsantrasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Biyoparçalanır stent formülasyonları ile bir karşılaştırma yapılabilmesi ve salım sürelerinde meydana gelen değişikliklerin sadece kaplama işlemi sonucunda oluşan yapılardan kaynaklandığının araştırılabilmesi için, formülasyon değiştirilmemiştir.

5.8.2.2. Kaplı Stentlerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Metalik yapıdaki stentlerin etkin madde içeren polimer çözeltileri ile kaplanmaları işlemi sonrasında, gerçekleştirilen kaplamanın yüzey özellikleri ve etkinliğinin değerlendirilmesi için SEM ile görüntüleme tekniği literatürde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir(154,163,170).

Şekil 4.38’de kaplama işlemi öncesinde metalik stentin yapısı görülmektedir. Metalik stentin kenarları, üretiminden sonra yuvarlatılmış ve cilalanmıştır. Bununla beraber stentin metalik kenarları, biyoparçalanır stentlere göre çok daha keskindir. Bu durum da stentin açılması sırasında damar duvarında yaratacağı kesik ve yaralanmayı artırmaktadır. Kaplama yapıldıktan sonra çekilen SEM resimleri, polimerik kaplamanın keskin stent kenarlarını çevrelediğini göstermiş olup, bu yapının damar duvarına vereceği hasarı azaltabileceği düşünülmektedir.

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) polimer çözeltileri içinde prednizolon asetat disperse edilmiş ve bu çözeltiler ile metalik stentler kaplanmıştır. Kaplı stent yapılarına ilişkin SEM görüntüleri incelendiğinde, yüksek büyütme oranlarında, her iki kaplama tabakası içinde disperse olmuş etkin madde kristalleri görülmektedir

(Şekil 4.40-41). Tez çalışmamız kapsamında hazırlanan biyoparçalanır stentlerin SEM görüntülerinde, stent yüzeyinde ve alınan kesitlerde ilaç kristalleri gözlenmemiştir. Bununla beraber optik mikroskop ve SEM görüntülerinde etkin maddenin homojen olarak disperse olduğu ve aglomerasyon göstermediği de gözlenmektedir.

Finkelstein ve diğ. (79), Lincoff ve diğ. (73), Caldwell ve diğ. (80), Westedt ve diğ. (163) ve Pjils ve diğ. (9) yaptıkları çalışmalarda, polimer kaplamasının metalik yüzeylere kolayca uygulanabildiğini, SEM ile inceleme sonucunda kaplamanın karakterizasyonlarının belirlenebildiğini, ilaç dağılımının polimer matriksi içinde tekdüze olarak gerçekleşebildiğini bildirmişlerdir.

Metalik stentlerinin PLGA polimerleri ile kaplanması sonucu oluşan kaplama tabakasının kalınlığı etkin madde salımını etkileyebilecek bir parametredir. Ancak kaplama tabakasının kalınlığı teknik yetersizlikler sebebiyle ölçülememiştir.

5.8.2.3. Prednizolon Asetat ve Prednizolon Asetat Yüklü Mikroküre İçeren Polimerlerle Kaplı Stentlerden İn Vitro Salım Çalışmaları

Biyoparçalanır polimerler kullanılarak hazırlanmış olan stent kaplama çözeltilerinin formülasyon ve üretim parametreleri optimize edildikten ve kaplanan stent yapıları üzerinde gerekli karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra farklı polimer tiplerinin etkin maddenin in vitro ortamda salımı üzerine etkileri incelenmiştir. Biyoparçalanır polimerler kullanılarak uygulanan kaplama yapısına girmesi uygun bulunan mikroküre formülasyonu (CM1PA20), % 1 (a/h) oranında orta molekül ağırlıklı kitosan polimeri ve polimerin ağırlıkça % 20'si oranında prednizolon asetat içeren formülasyondur.

Kaplı stentlerden etkin madde salımı için kullanılan yöntem, mikrokürelerden ve biyoparçalanır stentlerde in vitro salım çalışmalarında kullanılan yöntemle aynıdır. Bu sayede tez çalışmamızda bütün sistemlerde aynı in vitro salım yöntemi kullanılmış ve etkin madde salımları üzerindeki etkenlerin formülasyonlar ve üretilen

sistemler olması sağlanmıştır. Farklı in vitro salım yöntemi kullanılmaması formülasyonlar arasında karşılaştırılma yapılabilmesine olanak vermiştir.

PLGA (50:50) polimeri içinde prednizolon asetatın disperse edilmesiyle hazırlanan kaplama çözeltisi kullanılarak üretilen kaplı stentlerde ilk günün sonunda etkin madde salımı % 12,9 oranında olmuştur. Aynı polimer içine prednizolon asetat içeren kitosan mikroküre disperse edilmesi ile hazırlanan polimer çözeltisi kullanılarak hazırlanan kaplı stentlerden etkin madde salımı ise ilk günün sonunda % 4,2 oranındadır ve bu iki salım değeri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Yapıya giren mikroküreler etkin maddenin ortama salımını yavaşlatmıştır.

PLGA (75:25) polimeri içinde etkin madde disperse edildikten sonra metalik stentlerin kaplandığı stent yapılarından etkin madde salımı ilk günün sonunda % 12,5 oranındadır. Prednizolon asetat içeren kitosan mikrokürelerinin PLGA (75:25) polimeri içinde disperse edilmesi ile hazırlanan kaplama çözeltisi ile kaplanan metalik stentlerden salınan etkin maddenin oranı ise ilk günün sonunda yaklaşık % 1 oranında olmuştur.

Şekil 4.44’de verilen grafikte de görüleceği üzere, mikroküre içeren kaplamalardan etkin madde salımı, sadece prednizolon asetat içeren kaplamalara göre daha yavaş bulunmuştur. Mikrokürelerin kaplama amacıyla kullanılan PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerlerinin içinde disperse edilmesi hedeflenen amaca yaklaşılmasını sağlamış ve etkin maddenin salımını geciktirmiştir.

Prednizolon asetat içeren polimer çözeltileri ile yapılan kaplamalarda, etkin maddenin salımı polimer tipinden etkilenmiştir. PLGA (50:50) polimeri kullanıldığında, polimerin hidrofilik özelliğine bağlı olarak etkin maddenin tamamı 28. günün sonunda salınmıştır. PLGA (75:25) polimeri ile yapılan kaplama ise hidrofobik özelliğinin daha yüksek olmasına bağlı olarak etkin maddeyi daha yavaş salmakla beraber bir ay sonunda içerdiği prednizolon asetatın yaklaşık % 90’ını salmıştır. Sadece etkin maddenin kaplama matriksi içerisinde disperse edilmesi, tez

çalışmamızda kullanılan polimerlerle hazırlanan sistemler için etkin maddenin salımını bir ay uzatabilmiştir.

PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) polimerleri içerisinde prednizolon asetat yüklü kitosan mikrokürelerinin disperse edilmesiyle etkin madde salımı önemli ölçüde azalmıştır. Bir ay sonunda PLGA (50:50) ile yapılan kaplama formülasyonlarından etkin madde salımı polimerin hidrofilik özelliğine bağlı olarak, PLGA (75:25) polimeri kullanılarak hazırlanan formülasyonlara göre daha yüksek değerde olmuştur. PLGA (75:25) polimerinin içinde mikrokürelerin disperse edilmesiyle yapılan kaplama ile beklendiği şekilde en yavaş etkin madde salımı elde edilmiştir. Restenozun önlenmesi amacı ile geliştirilen formülasyonlar arasında, mikroküre içeren PLGA çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilen kaplamalar amaca uygun olarak kontrollü ve hızı önceden planlanabilen salım elde edilmesini sağlamışlardır.

SONUÇLAR

Tez çalışmalarımız kapsamında anjioplastide kullanılmak üzere biyoparçalanır kardiyovasküler stentler geliştirme amacıyla formülasyon ve in vitro karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, biyoparçalanır özellikte polimerler olarak farklı oranlarda PLGA (75:25) ve PLGA (50:50) kopolimerleri kullanılmış ve helikal yapıda, düzgün yüzeye sahip, prednizolon asetat ve prednizolon asetat yüklü mikroküre içeren (CM1PA20 kodlu mikroküre formülasyonu) stent yapıları üretilmiştir. Stent yapılarının içlerine yerleştirilerek in vitro salım özellikleri değerlendirilen mikrokürelerin hazırlanmasında, düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan tipleri kullanılmış ve formülasyonlar, bağımsız etkenlerin (kitosan konsantrasyonu ve hedeflenen etkin madde yükleme oranı) mikrokürelerin karakterizasyon parametreleri üzerindeki etkilerinin incelenebilmesi için 2² faktöriyel tasarım ile geliştirilmiştir. Biyoparçalanır stent formülasyonlarından beklenen, restenozun önlenmesi için uzun süreli ilaç salımı sağlamaları ve damar duvarının tekrar daralmaması için mekanik destek oluşturmalarıdır. Elde ettiğimiz deneysel sonuçlar bizi PLGA (50:50) polimeri kullanılarak üretilen biyoparçalanır stent yapılarının hızlı ilaç salımı gösterdikleri, mekanik olarak istenen dayanıklılıkta olmadıkları, restenozun engellenmesi için gereken sürelerde (en az 6 ay) fiziksel formlarını koruyamayacakları şeklinde bir sonuca ulaştırmıştır. PLGA (75:25) kullanılarak üretilen biyoparçalanır stentler ise kullanılan polimerin hidrofobik özelliklerine bağlı olarak in vitro salım ortamında ikinci ayın sonunda bile fiziksel yapılarında bir deformasyon oluşmadan, mekanik dirençlerini korumuştur. Ayrıca içerdikleri etkin maddenin uzun süreli salımını sağlamaları nedeniyle restenozun engellenmesi için üzerinde ileri çalışmalar yapılabilecek uygun formülasyonlar olabileceklerini düşündürmektedir. Farklı kopolimer oranlarındaki her iki polimer de kullanılarak üretilen yapılardan etkin maddenin salım özellikleri mikrokürelerin formülasyona girmesi ile modifiye edilebilmekte ve içerisine etkin madde yerine mikroküre yerleştirilmiş sistemlerden, daha uzun süreli salım sağlanabildiği görülmektedir.

Tez çalışmamızda üretilen ilaç içeren biyoparçalanır polimerlerle kaplı metalik stentlerin hazırlanmasında ise, PLGA (75:25) ve (50:50) polimerleri içine prednizolon asetat ya da prednizolon asetat yüklü mikroküreler eklenerek kaplama çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerle yapılan kaplama sonucunda polimer tabakasının stent yüzeyini homojen olarak çevrelediği, in vitro salım ortamında fiziksel bir bozunma ve deformasyon göstermeden içerdiği etkin maddenin uzun süreli salımını sağladığı gözlenmiştir. Böylece, restenozun engellenmesi amaçlı ilaç salan stent yapılarının geliştirilebilmesi için olumlu ve yapıcı bir adım atıldığı düşünülmektedir.

Geliştirilen formülasyonların in vivo deneylere taşınması halinde ise sterilizasyonları, bu tez kapsamında değerlendirilmemiş olmakla beraber göz önünde bulundurulması gereken önemli bir basamaktır. Üretilen yapıların uygun sterilizasyon yöntemleri seçilmeli ve bu sterilizasyon yönteminin stentlerin karakterizasyonu üzerindeki etkileri de incelenmelidir.

Sonuç olarak, çalışmalardan elde edilen veriler dikkate alındığında; anjioplastide kullanılmaya aday olmak üzere etkin madde/etkin madde yüklü mikroküre içeren biyoparçalanır stentlerin veya biyoparçalanır polimerle kaplı stentlerin formüle edilmesiyle organizma ile uyumlu biyoparçalanır özellikte olan, restenozun önlenmesi için kullanılması öngörülen stent şekilleri üzerinde formülasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapılarak sistem in vitro olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, karakterizasyonu yapılan, implante edilebilen biyoparçalanır kardiyovasküler medikal cihaz kapsamına girdiği öngörülen stentlerin, restenozun önlenmesine yönelik damar duvarında uzun süreli, lokal olarak yüksek konsantrasyonda etkin madde sağlanması gibi konularda üstünlük sağlayabilecek, alternatif bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ranade, V.V., Drug delivery systems 4.implants in drug delivery, J. Clin. Pharmacol., 30, 871-889, 1990.
2. Chien, Y.W., Implantable therapeutic systems, "Controlled Drug Delivery" (Ed. J.R. Robenson ve V.H.L. Lee)'de, Mercel dekker, New York, s. 481-522.
3. Danckwerts, M., Fassihi, A., Implantable controlled release drug delivery systems: A review, Drug Dev. Ind. Pharm., 17(11), 1465-1502, 1991.
4. Wu, P., Grainger, D.W., Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, Biomaterials, 27, 2450-2467, 2006.
5. Şamdancıoğlu, S., Çalış, S., Şumnu, M., Hıncal, A.A., Formulation and in vitro evaluation of bisphosphonate loaded microspheres for implantation in osteolysis, Drug Dev. Ind. Pharm., 32, 473-481, 2006.
6. Yenice, B., Çalış, S., Atilla, B., Kaş, H.S., Özalp M., Ekizoğlu, M., Bilgili, H., Hıncal, A.A., In vitro/in vivo evaluation of the efficiency of teicoplanin-loaded biodegradable microparticles formulated for implantation to infected bone defects, J. Microencapsul., 20(6), 705-717, 2003.
7. Padera, R.F. ve Schoen, F.J., Cardiovascular Medical Devices, "Biomaterials Science" (Ed. B.D.Ratner, A.S.Hoffman, F.J.Schoen ve J.E.Lemons)'da II.Baskı, Elsevier Academic Press, California, s. 472-494, 2004.
8. Gürsoy, A.Z., Oküler Sistemler, "Kontrollü Salım Sistemleri" (Ed. Gürsoy A.Z.)'de, Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 2002.
9. Pijls, R.T., Hanssen, H.H.L., Nujits R.M.M.A. ve Koole, L.H., Flexible coils with a drug-releasing hydrophilic coating: A new platform for controlled delivery of drugs to the eye?, BioMed. Mater. Eng., 14, 383-393, 2004.
10. Jacobs, T.S., Won, J., Gravereaux, E.C., Faries, P.L., Morrissey, N., Teodorescu, V.J., Hollier, L.H. ve Marin, M.L., Mechanical failure of

prosthetic human implants: A 10-year experience with aortic stent graft devices, *J. Vasc. Surg.*, 37, 16-26, 2003.

11. Sousa, J.E., Serruys, P.W., Costa, M.A., New frontiers in cardiology drug-eluting stents: Part II, *Circulation*, 107, 2383-2389, 2003.
12. Olson H.W., Basic Concepts of Medical Instrumentation, "Medical Instrumentation, Application and Design" (Ed. Webster J.G.)'da III.Baskı, John Wiley Sons, Inc., Canada, s. 4-42, 1998.
13. Cook A., General Concepts, "Therapeutic Medical Devices, Application and Design" (Ed. Cook A.M., Webster J.G.)'da, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, s. 1-28, 1982.
14. Türkiye Cumhuriyeti Tıbbi Cihaz Yönetmeliği, Tarihi:13.03.2002 Sayısı:24694[online]. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı. <http://www.saglik.gov.tr/sb/default.asp?sayfa=mevzuat&cid=3> [14/4/2006]
15. Medical Device Definition [online]. US Food and Drug Administration. http://www.fda.gov/cdrh/devadvice/312.html#link_2 [21/2/2006].
16. Council Directive 93/42/EEC Concerning Medical Devices. European Commission. http://ec.europa.eu/enterprise/medical_devices/legislation_en.htm [18/8/2005].
17. Shin, J.H., Song, H-Y., Choi, C.G., Yuk, S.H., Kim, J-S., Kim, Y.M., Yoon, C.J., Kim, T-H., Suh, J-Y., He, X., Tissue hyperplasia: Influence of a paclitaxel-eluting covered stent-preliminary study in a canine urethral model, *Radiology*, 234, 438-444, 2005.
18. Hara, N., Koike, H., Bilim, V. ve Takahashi, K., Placement of a urethral catheter into the ureter: An unexpected complication after retropubic suspension, *Int. J., Urol.*, 12, 217-219, 2005.
19. Leclair, M-D., Camby, C., Batisti, S., Renaud, G., Plattner, V., Heloury, Y., Unstented tubularized incised plateurethroplasty combined with foreskin reconstruction for distal hypospadias, *Eur. Urol.*, 46, 526-530, 2004.

20. Roberge, R.J., Keller, C. ve Garfinkel, M., Vaginal pessary-induced mechanical bowel obstruction, *J. Emergency Med.*, 20(4), 367-370, 2001.
21. Koromila, G., Michanetzis, G.P.A., Missirlis, Y.F., Antimisiaris, S.G., Heparin incorporating liposomes as a delivery system of heparin from PET-covered metallic stents: Effect on haemocompatibility, *Biomaterials*, 27, 2525-2533, 2006.
22. Babapulle, M.N. ve Eisenberg, M., Coated stents for the prevention of restenosis: Part I, *Circulation*, 106, 2734-2740, 2002.
23. Hill, R., Bagust, A., Bakhui, A., Dickson, R., Dündar, Y., Haycox, A., Mota, R.M., Reaney, A., Roberts, D., Williamson, P., Walley, T., Coronary artery stents: a rapid systematic review and economic evaluation, *Health Technol. Assess.*, 8(35), 1-274, 2004.
24. Zilberman, M., Schwade, N.D., Eberhart, R.C., Protein-loaded bioresorbable fibers and expandable stents: Mechanical properties and protein release, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 69B, 1-10, 2004.
25. Zilberman, M., Dexamethasone loaded bioresorbable films used in medical support devices: Structure, degradation, crystallinity and drug release, *Acta Biomaterialia*, 1, 615-624, 2005.
26. Hunter, W.L., Drug-eluting stents: Beyond the hyperbole, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 347-349, 2006.
27. Bosetti, M., Masse, A., Tobin, E., Cannas, M., Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity, *Biomaterials*, 23, 887-892, 2002.
28. Middleton, J.C., Tipton, A.J., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, 21, 2335-2346, 2000.
29. Park, H., Park, K., Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems, *Pharm. Res.*, 13(12), 1770-1776, 1996.
30. Fattori, R., Piva, T., Drug-eluting stents in vascular intervention, *Lancet*, 361, 247-249, 2003.

31. Tsuji, T., Tamai, H., Igaki K., Kyo, E., Kosuga, K., Hata, T., Okada, M., Nakamura, T., Fujita, S., Takeda, S., Motohara, S. ve Uehata, H., Biodegradable stents as a platform to drug loading, *Int. J. Cardiovasc. Intervent.*, 5, 13-16, 2003.
32. Burt H. Ve Hunter W., Drug-eluting stents: an innovative multidisciplinary drug delivery platform, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 345-346, 2006.
33. Bennett, M.R., O'Sullivan, M., Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy, *Pharmacol. Ther.*, 91, 149-166, 2001.
34. Winslow, R.D., Sharma, S.K. ve Kim, M.C., Restenosis and drug-eluting stents, *Mt. Sinai J. Med.*, 72(2), 81-89, 2005.
35. Pires, N.M.M., van der Hoevenb, B.L., de Vriesa, M.R., Havekes, L.M., van Vlijmen, B.J., Hennink, W.E., Quax, P.H.A., Jukema, J.W., Local perivascular delivery of anti-restenotic agents from a drug-eluting poly(ϵ -caprolactone) stent cuff, *Biomaterials*, 26, 5386-5394, 2005.
36. Nuutinen, J-P., Clerc, C., Reinikainen, R., Tormala, P., Mechanical properties and in vitro degradation of bioabsorbable self-expanding braided stents, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 14(3), 255-266, 2003.
37. Vyavahare, N.R., Hirsch, D., Lerner, E., Baskin, J.Z., Zand, R., Schoen, F.J. ve Levy, R.J., Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: Mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships, *J. Biomed. Mater. Res.*, 40, 577-585, 1998.
38. Linde, J. ve Strauss, B.H., Pharmacological treatment for prevention of restenosis, *Expert Opin. Emerging Drugs*, 6(2), 281-302, 2001.
39. Schwartz, R.S., Chronos, N.A., Virmani, R., Preclinical restenosis models and drug-eluting stents, still important, still much to learn, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 44, 1373-1385, 2004.
40. Medicinal Product Directive 65/65/EEC.
41. Medical Devices:Guidance Document MEDDEV 2. 1/3 rev 2 July 2001.

42. Medical Devices Sector [online]. European Commission .
http://ec.europa.eu/enterprise/medical_devices/index_en.htm [26/7/2006].
43. Les Schnoll, The CE Mark:Medical Device Directive Part I-II [online].
<http://www.qualitydigest.com/sept97/html/ce-mdd.html> [21/2/2006].
44. Linda Horton, Medical Device Regulation in the European Union, Food and Drug Law Journal, Vol.50, s. 461-476, 1995.
45. Medical Devices: Guidance Document MEDDEV 2.4/1 rev.8 july 2001, Guidelines for the Classification of Medical Devices.
46. Hill, R., Bagust, A., Bakhai, A., Dickson, R., Dündar, Y., Haycox, A., Mota, R.M., Reaney, A., Roberts, D., Williamson, P. ve Walley, T., Coronary arthery stents: A rapid systemic review and economic evaluation, Health Technol. Asses., 8,35, 2004.
47. Mann M.J. ve Davies J.M., Epidemiology and pathophysiology of coronary artery disease, “Practical Interventional Cardiology”de, II. Baskı, Martin Dunitz Ltd., Londra, s. 1-8, 2002.
48. Byun Y., Jung Han Y., Multi-coated drug-eluting stent for antithrombosis and antirestenosis, Amerikan Patenti 6.702.850, 2004.
49. Burt, H.M. ve Hunter W.L., Drug-eluting stents: A multidisciplinary success story, Adv. Drug Deliv. Rev., 58, 350– 357, 2006.
50. Chen, M-C., Liang, H-F., Chiu, Y-L., Chang, Y., Wei, H-J., Sung, H-W., A novel drug-eluting stent spray-coated with multi-layers of collagen and sirolimus, J. Control. Release, 108, 178-189, 2005.
51. Grech E.D., Pathophysiology and investigation of coronary artery disease, “ABC of Interventional Cardiology”de, BMJ Publishing Group, Londra, s. 1-6, 2003.
52. Yock, C.A., Boothroyd, D.B., Owens, D.K., Garber, A.M., Mark A. Hlatky, M.A., Cost-effectiveness of bypass surgery versus stenting in patients with multivessel coronary artery disease, Am. J. Med., 115, 382–389, 2003.

53. Boden, W.E., Surgery, angioplasty, or medical therapy for symptomatic multivessel coronary artery disease is there an indisputable “winning strategy” from evidence-based clinical trials?, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 43(10), 1752-1754, 2004.
54. Michaels, A.D. ve Chatterjee, K., Angioplasty versus bypass surgery for coronary artery disease, *Circulation*, 106, 187-190, 2002.
55. Boden, W.E., Is it time to reassess the optimal timing of coronary artery bypass graft surgery following acute myocardial infarction, *Am. J. Cardiol.*, 90, 35-38, 2002.
56. Gruentzig A.R., Myler R.K., Hanna E.H., Coronary transluminal angioplasty, *Circulation*, 55-56 (Suppl III): III-84, 1977.
57. Feeney, T., Faxon, D.P., Defining the clinical problem, “D. Restonosis: A Guide to Therapy”, CRC Press LLC, New York, s. 1-8, 2001.
58. Yip, P.S., Tsang, P.H.W., Ho, H., Limon, T., Atladottir, S.M., Intravascular stent, Amerikan Patenti US 6.846.323, 2005.
59. ACC/AHA guidelines for percutaneous coronary intervention – executive summary. *Circulation* 2001; 103: 3019–3041.
60. van der Hoeven, B.L., Pires, N.M.M., Ward, H.M., Oemrawsingh, P.V., van Vlijmen, B.J.M., Quax, P.H.A., Schalij, M.J., van der Wall, E.E., Jukema, J.W., Drug-eluting stents: results, promises and problems, *Int. J. Cardiol.*, 99, 9-17, 2005.
61. Yamawaki, T., Shimokawa, H., Kozi, T., Miyata, K., Higo, T., Tanaka, E., Egashira, K., Shiraishi, T., Tamai, H., Igaki, K., Takeshita, A., Intramural delivery of a specific tyrosine kinase inhibitor with biodegradable stent suppresses the restenotic changes of the coronary artery in pigs in vivo, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 32, 780-786, 1998.
62. Joung, Y.K., Kim, H.I., Kim, S.S., Chung, K.H., Jang, Y.S., Park, K.D., Estrogen release from metallic stent surface for the prevention of restenosis, *J. Control. Release*, 92, 83-91, 2003.

63. Karthikeyan, G. ve Bhargava, B., Prevention of restenosis after coronary angioplasty, *Curr. Opin. Cardiol.*, 19, 500-509, 2004.
64. Khan, I.A., Patravale, V.B., The intra-vascular stent as a site-specific local drug delivery system, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31, 59-78, 2005.
65. Alexis, F., Venkatraman, S.S., Rath, S.K., Boey, F., In vitro study of release mechanisms of paclitaxel and rapamycin from drug-incorporated biodegradable stent matrices, *J. Control. Release*, 98, 67-74, 2004.
66. Bertrand, O.F., Sipehia, R., Mongrain, R., Rode's J., Tardif, J-C., Bilodeau, L., Cote, G., Bourassa, M.G., Biocompatibility Aspects of New Stent Technology, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 32, 562-571, 1998.
67. Moore J.E., Jalisi M., Moreno M., Crumpler E., Minimally Invasive Cardiovascular Technologies, "Biomedical technology and devices handbook" da [electronic resource], CRC Press, Boca Raton, 2004.
68. Chorny M., Fishbein I., Golomb G., Drug delivery systems for the treatment of restenosis, *Crit. Rev. Ther. Drug Car. Sys.*, 17 (3), 249-284, 2000.
69. Smith ve ark., ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention, ACC/AHA/SCAI Practice Guidelines, 2005.
70. Waksman, R., Drug-eluting stents, From bench to bed, *Cardiovascular Radiation Med.*, 3, 226-241, 2002.
71. Kipshidze, N., Dangas, G., Tsapenko, M., Moses, J., Leon, M.B., Kutryk, M., Serruys, P., Role of the endothelium in modulating neointimal formation vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 44, 733-739, 2004.
72. Bhargava, B., Karthikeyan, G., Abizaid, A.S., and Mehran, R., New approaches to preventing restenosis, *BMJ*, 327, 274-279, 2003.
73. Lincoff, A.M., Furst, J.G., Ellis, S.G., Tuch, R.J., Topol, E.J., Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 29, 808-816, 1997.

74. Kallinteria, P., Antimisiaris, S.G., Karnabatidis, D., Kalogeropoulou, C., Tsiab, I., Siablis, D., Dexamethasone incorporating liposomes: an in vitro study of their applicability as a slow releasing delivery system of dexamethasone from covered metallic stents, *Biomaterials*, 23, 4819–4826, 2002.
75. Tanabe, K., Regar, E., Lee, C.H., Hoye, A., van der Giessen, W., Serruys, P.W., Local drug delivery using coated stents: new developments and future perspectives, *Curr. Pharm. Des.*, 10, 357–367, 2004.
76. Jackson, J.K., Smith, J., Letchford, K., Babiuk, K.A., Machan, L., Signore, P., Hunter, W.L., Wang, K., Burt, H.M., Characterization of perivascular poly(lactic-co-glycolic acid) films containing paclitaxel, *Int. J. Pharm.*, 283, 97–109, 2004.
77. Ranade, S.V., Miller, K.M., Richard, R.E., Chan, A.K., Allen, M.J., Helmus, M.N., Physical characterization of controlled release of paclitaxel from the TAXUSTM Express²TM drug-eluting stent, *J. Biomed. Mater. Res.*, 71A, 625–634, 2004.
78. Prietzel, K., Pasquantonio, J., Fliedner, T., Stemberger, A., Jancewski, M., Inhibition of neointimal proliferation with a novel hirudin/prostacyclin analog eluting stent coating in an animal over stretch model [abstract], *Circulation*, 94, 260, 1996.
79. Finkelstein, A., McClean, D., Kar, S., Takizawa, K., Varghese, K., Baek, N., Park, K., Fishbein, M.C., Makkar, R., Litvack, F., Eigler, N.L., Local drug delivery via a coronary stent with programmable release pharmacokinetics, *Circulation*, 107, 777–784, 2003.
80. Caldwell, R.A., Vyavahare, N., Langan, E.M., LaBerge, M., Matrix metalloproteinase inhibitor within an absorbable coating for vascular applications: Delivery device characterization and the reduction of smooth muscle cell proliferation and migration, *J. Biomed. Mater. Res.* 67A, 1–10, 2003.

81. Drachman, D.E., Edelman, E.R., Seifert, P., Groothuis, A.R., Bornstein, D.A., Kamath, K.R., Palasis, M., Yang, D., Nott, S.H., Rogers, C., Neointimal thickening after stent delivery of paclitaxel: Change in composition and arrest of growth over six months, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 36, 2325-32, 2000.
82. De Scheerder I, Wang K, Wilcek K, et al. Local methylprednisolone inhibition of foreign body response to coated intracoronary stents. *Coron. Artery. Dis.*, 7, 161–166, 1996,
83. Ed. Serruys P. ve Rensing B., *Handbook of Coronary Stents*, IV. Baskı, Martin Dunitz, İngiltere, 2002.
84. Yang C. ve Burt H., Drug-eluting stents: Factors governing local pharmacokinetics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 402-411, 2006.
85. Acharya, G., Park. K., Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58, 387-401, 2006.
86. Kutryk M.J.B. ve Serruys P.W., *Stents: The Menu*, “Textbook of Interventional Cardiology”(Ed. Topol E.J.)’de, IV.Baskı, Saunders, Philadelphia, s.591-630, 2003.
87. Dailey, L.A. ve Kissel, T., New poly(lactic-co-glycolic acid) derivatives: Modular polymers with tailored properties, *Drug Discov. Today: Technologies*, 2(1), 7-13, 2005.
88. Wang, X., Venkatraman, S.S., Boey, F.Y.C., Loo, J.S.C., Tan, L.P., Controlled release of sirolimus from a multilayered PLGA stent matrix, *Biomaterials*, baskıda, 2006.
89. Su, S-H., Chao, R.Y.N., Landau, C.L., Nelson, K.D., Timmons, R.B., Meidell, R.S. ve Eberhart, R.C., Expandable bioresorbable endovascular stent. I. Fabrication and properties, *Ann. Biomed. Eng.*, 31, 667-677, 2003.
90. Venkatraman, S., Poh, T.L., Vinalia, T., Mak, K.H., Boey, F., Collapse pressures of biodegradable stents, *Biomaterials*, 24, 2105-2111, 2003.

91. Valimaa, T., Laaksovirta S., Degradation behaviour of self-reinforced 80L/20G PLGA devices in vitro, *Biomaterials*, 25, 1225-1232, 2004.
92. Hietala, E-M., Salminen, U-S., Stahls, A., Valimaa, T., Maasilta, P., Tormala, P., Nieminenc, M.S., Harjula, A.L.J., Biodegradation of the copolymeric polylactide stent long-term follow-up in a rabbit aorta model, *J. Vasc. Res.*, 38, 361-369, 2001.
93. Vogt, F., Stein, A., Rettemeier, G., Krott, N., Hoffmann, R., vom Dahl, J., Bosserhoff, A.K., Michaeli, W., Hanrath, P., Weber, C., Blindt, R., Long-term assessment of a novel biodegradable paclitaxel-eluting coronary polylactide stent, *Eur. Heart J.*, 25, 1330-1340, 2004.
94. Yoon, J.J., Kim, J.H., Park, T.G., Dexamethasone-releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated, by a gas-foaming/salt-leaching method, *Biomaterials*, 24, 2323-2329, 2003.
95. Venkatraman, S.S., Tan, L.P., Joso, J.F.D., Chiang, Y., Boey, F., Wang, X., Biodegradable stents with elastic memory, *Biomaterials*, 27(8), 1573-1578, 2006.
96. Tunçay M., Çalış S., Kaş H.S., Ercan M.T., Peksoy İ., Hıncal, A.A., "In Vitro and In Vivo Evaluation of Diclofenac Sodium Loaded Albumin Microspheres", *J. Microencapsul.*, 17 (2) 145-156, 2000.
97. Illum, L., Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm. Res.*, 15(9), 1326-1331, 1998.
98. Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal K., Dhawan S., Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *Int. J. Pharm.*, 274, 1-33, 2004.
99. Arıca B., Çalış S., Kaş H.S., ve Hıncal A.A., Chitosan microspheres of ibuprofen: evaluation and in vitro characterization, "Chitosan in Pharmacy and Chemistry"(Ed. Muzarelli R.A.A. ve Muzarelli C.)'de, Atec, İtalya, s.71-76, 2002.
100. Onishi, H., Oosegi, T., Machida, Y. ve McGinity, J.M., Preparation and in vitro evaluation of chitosan microspheres containing prednisolone:

Comparison of simple and conjugate microspheres, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31, 597-605, 2005.

101. He, P., Davis, S.S., Illum, L., Chitosan microspheres prepared by spray drying, *Int. J. Pharm.*, 187, 53-65, 1999.
102. Erden, N. ve Çelebi N., Kitin ve kitozanın farmasötik teknolojideki kullanışı, *FABAD Farm. Bil. Der.*, 15, 277-287, 1990.
103. Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi T.M., Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Control. Release*, 100, 5-28, 2004.
104. Khor, E., Lim, L.Y., Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, 24, 2339-2349, 2003.
105. Lorenzo-Lamosa, M.L., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery, *J. Control. Release*, 52, 109–118, 1998.
106. Genta, I., Costantinib, M., Asti, A., Conti, B., Montanarib, L., Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres, *Carbohydrate Polymers*, 36, 81-88, 1998.
107. Lucinda- Silva, R.M., Evangelista, R.C., Microspheres of alginate-chitosan containing isoniazid, *J. Microencapsul.*, 20(2), 145-152, 2003.
108. Wang, F. J., Wang, C. H., Sustained release of etanidazole from spray dried microspheres prepared by non-halogenated solvents, *J. Control Release*, 81(3), 263-280, 2002.
109. Desai, K.G.H., Park, H.J., Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying, *J. Microencapsul.*, 22(2), 179-192, 2005.
110. He, P., Davis, S.S. ve Illum, L., Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods, *J. Microencapsul.*, 16(3), 343-355, 1999.

111. Filipovic-Grcic, J., Voinovich, D., Moneghini, M., Becirevic-Lacan, M., Magarotto, L., Jalsenjak, I., Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone–hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 9, 373-379, 2000.
112. Huang, Y.C., Yeh, M.K., Cheng, S.N. ve Chiang, C.H., The characteristics of betamethasone-loaded chitosan microparticles by spray-drying method, *J. Microencapsul.*, 20(4), 459-472, 2003.
113. Giunchedi, P., Genta, I., Conti, B., Muzzarelli, R.A.A., Conte, U., Preparation and characterization of ampicillin loaded methylpyrrolidinone chitosan and chitosan microspheres, *Biomaterials*, 19, 157-61, 1998.
114. Hascicek, C., Gönül, N. ve Erk, N., Mucoadhesive microspheres containing gentamicin sulfate for nasal administration: preparation and in vitro characterization, *Farmaco*, 58(1), 11-16, 2003.
115. Giunchedi, P., Juliano, C., Gavini, E., Cossua, M., Sorrenti, M., Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 53, 233-239, 2002.
116. Ganza-Gonzalez, A., Anguiano-Igea, S., Otero-Espinar, F.J., Blanco Mendez, J., Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 48, 149-155, 1999.
117. Asada, M., Takahashi, H., Okamoto, H., Tanino, H., Danjo, K., Theophylline particle design using chitosan by the spray drying, *Int. J. Pharm.*, 270, 167–174, 2004.
118. Gavini, E., Hegge, A.B., Rassu, G., Sanna, V., Testa, C., Pirisino, G., Karlsen, J., Giunchedi, P., Nasal administration of carbamazepine using chitosan microspheres: In vitro/in vivo studies, *Int. J. Pharm.*, 307, 9-15, 2006.
119. Cevher, E., Orhan, Z., Mülazımoğlu, L., Şensoy, D., Alper, M., Yıldız, A., Özsoy, Y., Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused

- by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres, Int. J. Pharm., 317, 127–135, 2006.
120. Martinac, A., Filipovic-Grcic, J., Voinovich, D., Perissutti, B., Franceschinis, E., Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery, Int. J. Pharm., 291, 69–77, 2005.
 121. Montgomery, D.C., Introduction to factorial designs, “Design and Analysis of experiments” (Ed. D.C. Montgomery)’da, John Wiley & Sons, New York, s. 228-290, 1997.
 122. Arıca, B., Beyine İmplantı Edilen Sentetik ve Doğal Biyoparçaları Polimerlerle Hazırlanan Mikroküre Formülasyonlarının Optimizasyonu, İn Vitro/İN Vivo Değerlendirilmeleri Üzerine Çalışmalar, Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1998.
 123. Kayaalp, O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-TAŞ, Ankara, 2000
 124. Green, B., Leake, R.E., Steroid Hormones a Practical Approach, IRL Press limited, Oxford, 1987.
 125. Porfitt, K., Porsons, A.V., Sweetman, S. C., Martindale The Extra Pharmacopeia, The Pharmaceutical Press, Londra, 1989.
 126. Moffat, A. C., Jackson, J. V., Moss, M. S., Widdop, B., Clarke’s Isolation and Identification of Drugs, 2.Basım, The Pharmaceutical Press, Londra, 1986.
 127. O’Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E., Obenchain, J. R., Gallipeau, J. A. R., D’Arecca, Budavari, S., The Merck Index, 13. Basım, Merck & Co. Inc., NJ, 2001.
 128. United States Pharmacopeia National Formulary, Twenty-Second Revision, 1990.
 129. Görög, S., Methods used in steroid analysis, “Steroid Analysis In The Pharmaceutical Industry; Hormonal Steroids, Sterols, Vitamins D, Cardiac Glycosides” (Ed. S. Görög)’de, Ellis Horwood Limited, England, s. 5-181, 1989.

130. Gallego, J.M.L., Arroyo, J.P., Determination of prednisolone and the most important associated compounds in ocular and cutaneous pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. B*, 784, 39–47, 2003.
131. Wolthers , B.G., Kraan , G.P.B., Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry of steroids, *J. Chromatogr. A*, 843, 247 –274, 1999.
132. Ma, Y.C., ve Kim, H.Y., Determinations of steroids by liquid chromatography/ mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 8, 1010-1020, 1997.
133. Zarzycki, P.K., Kulhanek, K.M., Smith, R., Clifton, V.L., Determination of steroids in human plasma using temperature-dependent inclusion chromatography for metabolomic investigations, *J. Chromatogr. A*, 1104, 203–208, 2006.
134. Ferenczi-Fodor, K., Vegh, Z., Renger, B., Thin-layer chromatography in testing the purity of pharmaceuticals, *Trends in Analytical Chemistry*, baskıda, 2006.
135. Coelho, A.L., Aucelio, R.Q., Photochemical induced fluorescence for the determination of prednisolone and triamcinolone, *Analytical Letters*, 39, 619–630, 2006.
136. Simone, J.N., Pendelton, R.A., Jenkins, J.E., Comparison of the efficacy and safety of ketorolac tromethamine 0.5% and prednisolone acetate 1% after cataract surgery, *J. Cataract Refract. Surg.*, 25, 699–704, 1999.
137. Giugliano, G.R., Giugliano, R.P., Gibson, C.M. ve Kuntz, R.E., Meta-analysis of corticosteroid treatment in acute myocardial infarction, *Am. J. Cardiol.*, 91, 1055–1059, 2003.
138. Haynes, C.R., Murad, F., Adrenocorticotrophic Hormone ; Adrenocortical Steroids and Their Synthetic Analogs; Inhibitors of Adrenocortical Steroid Biosynthesis, “Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of

- Therapeutics”(Ed. G.A. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall ve F.Murad)’de, VII.Baskı, Mac Millan Publishing, London, s.1459-1490, 1985.
139. Safety (MSDS) data for prednisolone acetate[online], The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory Oxford University, http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/PR/prednisolone_acetate.html [12/08/2005]
 140. Prasad, V.K., Ho, B., Haneke, C., Simultaneous determination of prednisolone acetate, prednisolone, prednisone, cortisone and hydrocortisone in swine plasma using solid-phase and liquid-liquid extraction techniques, J. Chromatogr., 13, 378(2), 305-316, 1985.
 141. Marciniak, B., Kozak, M., Wachowski, L., Ogrodowczyk, M., Evaluation of radiostability of some steroid derivatives, J. Therm. Anal. Calorimetry, 73, 473-485, 2003.
 142. Ommat, R., Vademecum, Pelikan Yayınevi, 2006.
 143. Physicians’ Desk Reference (PDR), 58. Baskı, 2004.
 144. Gallego, J.M.L., Arroyo, J.P., Determination of prednisolone acetate, sulfacetamide and phenylephrine in local pharmaceutical preparations by micellar electrokinetic chromatography, J. Pharm. Biomed. Anal., 31, 873-884, 2003.
 145. Bruylants, G., Wouters, J., Michaux, C., Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design, Curr. Med. Chem., 12(17), 2011-2020, 2005.
 146. Bresolle, F., Bromet-Petit, M., Audran, M., Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics, J. Chromatogr. B Biomed. App., 686(1), 3-10, 1996.
 147. Guideline for Industry Text on Validation of Analytical Procedures, ICH Q-2A, 1995.
 148. Chen, R., Okamoto, H., Danjo, K., Particle Design Using a 4-Fluid-Nozzle Spray-Drying Technique for Sustained Release of Acetaminophen, Chem. Pharm. Bull., 54(7), 948-953, 2006.

149. Shi, X.Y., Tan, T.W., Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D₂, *Biomaterials*, 23, 4469-4473, 2002.
150. Filipović-Grčić J., Perissutti, B., Moneghini M., Voinovich D., Martinac A., Jalšenzak I., Spray-dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterisation, *J. Pharm. Pharmacol.*, 55, 7, 921-931, 2003.
151. Jameela, S.R., Kumary, T.V., Lal, A.V., Jayakrishnan, A., Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system, *J. Control. Release*, 52, 17-24, 1998.
152. Sayın, B., Antibiyotik Yüklü Allogreftler Ve Biyopolimerik Mikropartiküllerin Enfekte Kemik Defektlerine İmplantasyonu Ve Etkinliklerinin Değerlendirilmesi, *Farmasötik Teknoloji Programı Bilim Uzmanlığı Tezi*, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003.
153. Chu, C.C., Biodegradable Polymeric Biomaterials: An Updated Overview, "Biomedical Engineering Handbook"(Ed. J.D. Bronzino)'da, II.Baskı, CRC Press, Amerika, s.41/1-41/22, 2000.
154. Zilberman, M., Eberhart, R.C., Schwade, N.D., In vitro study of drug-loaded bioresorbable films and support structures, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 13(11), 1221-1240, 2002.
155. Huda, M.S., Yasui, M., Mohri, N., Fujimura, T., Kimura, Y., Dynamic mechanical properties of solution-cast poly(L-lactide) films, *Materials Science and Engineering*, A333, 98-105, 2002.
156. Wang, Y., Challa, P., Epstein, D.L., Yuan, F., Controlled release of ethacrynic acid from poly(lactide-co-glycolide) films for glaucoma treatment, *Biomaterials*, 25, 4279-4285, 2004.
157. Dorta, M.J., Santovena, A., Llabres, M., Farina, J.B., Potential applications of PLGA film-implants in modulating in vitro drugs release, *Int. J. Pharm.*, 248, 149-156, 2002.

158. Tan, L.P., Venkatraman, S.S., Sung, P.F., Wang, X.T., Effect of plasticization on heparin release from biodegradable matrices, *Int. J. Pharm.*, 283, 89-96, 2004.
159. Venkatraman, S., Chiang, B.Y., Polymeric stent and method of manufacture, *Dünya Patenti WO2004110315*, 2004.
160. Du, J., Jasti, B., Vasavada, R.C., Controlled release of tobramycin sulfate from poly(ortho esters) implantable discs for the treatment of osteomyelitis, *J. Control. Release*, 43 223-233, 1997.
161. Schliecker G., Schmidt, C., Fuchs, S., Wombacher, R., Kissel, T., Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity, *Int. J. Pharm.*, 266, 39-49, 2003.
162. Santovenia, A., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Llabres, M., Farina, J.B., Rheological properties of PLGA film-based implants: correlation with polymer degradation and SPf66 antimalaric synthetic peptide release, *Biomaterials*, 25, 925-931, 2004.
163. Westedt, U., Wittmar, M., Hellwig, M., Hanefeld, P., Greiner, A., Schaper, A.K., Kissel, T., Paclitaxel releasing films consisting of poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) and their potential as biodegradable stent coatings, *J. Control. Release*, 111, 235-246, 2006.
164. Zhang, X.Z., Lewis, P.J., Chu, C.C., Fabrication and characterization of a smart drug delivery system: microsphere in hydrogel, *Biomaterials*, 26, 3299–3309, 2005.
165. Tang, Z.G., Balck, R.A., Curran, J.M., Hunt, J.A., Rhodes, N.P., Williams, D.F., Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ϵ -caprolactone] films, *Biomaterials*, 25, 4741-4748, 2004.
166. Jayaraman, S., Process for coating a surface of a stent, *Amerikan Patenti*, US 6.517.889, 2003.
167. Cheng, P., Tremble, P., Gradient coated stent and method of fabrication, *Dünya Patenti WO2006023150*, 2006.

168. Pathak, C. P., Implantable medical devices with fluorinated polymer coatings, and methods of coating thereof, Dünya Patenti, WO2005061023, 2005.
169. Schulze, J. E., Betts, R. E., Polymer compositions containing a macrocyclic triene compound, Dünya Patenti WO03090684, 2003.
170. Pijls, R.T., Sonderkamp, T., Daube G.W., Krebber, R., Hanssen, H.H.L., Nuijts, R.M.M.A., Koole, L.H., Studies on a new device for drug delivery to the eye, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59, 283-288, 2005.
171. AIST: Integrated Spectral Database System of Organic Compounds (Data are provided by the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan)).
172. Shabir, G., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A*, 987, 57-66, 2003.
173. Ko, J.A., Park, H.J., Hwang S.J., Park, J.B., Lee, J.S., Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 249, 165-174, 2002.
174. Martinac, A., Filipovic-Grcic, J., Barbaric, M., Zorc, B., Vionovich, D., Jalsenjak, I., Gemfibrozil encapsulation and release from microspheres and macromolecular conjugates, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 17, 207-216, 2002.
175. Takahashi, H., Chen, R., Okamoto, H., Danjo, K., Acetaminophen Particle Design Using Chitosan and a Spray-Drying Technique, *Chem. Pharm. Bull.*, 53(1), 37-41, 2005.
176. Huang, Y.C., Yeh, M.K., Chiang, C.H., Formulation factors in preparing BTM-chitosan microspheres by spray drying method, *Int. J. Pharm.*, 242, 239-242, 2002.
177. Norton, L.W., Tegnell, E., Toporek, S.S., Reichert, W.M., In vitro characterization of vascular endothelial growth factor and dexamethasone

- releasing hydrogels for implantable probe coatings, *Biomaterials*, 26, 3285-3297, 2005.
178. Blanco, M.D., Gomez, C., Olmo, R., Muniz, E., Teijon, J.M., Chitosan microspheres in PLG films as devices for cytarabine release, *Int. J. Pharm.*, 202, 29-39, 2000.
179. Su, S.H., Lin, T.L., Methods for coating implants, *Amerikan Patenti* US6.844.024, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

11.04.1981 tarihinde Ankara’da doğdum. İlkokulu Bahçelievler İlkokulu’nda, ortaokulu Bahçelievler Ortaokulu’nda, lise öğrenimimi ise Etimesgut Mehmetçik Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı Lise)’nde tamamladım. 1999 yılında yüksek öğrenimime başladığım Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ni 2003 yılında bitidim ve aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2004 yılında araştırma görevlisi olarak başladığım görevime halen aynı yerde devam etmekteyim.

EKLER

EK 1: YAPILAN BİLDİRİLER

EK 2: TRANSKRİPT

EK 1: YAPILAN BİLDİRİLER

5th World Meeting
on Pharmaceutics
Biopharmaceutics
and Pharmaceutical
Technology

GENEVA

Switzerland 27th -30th March 2006

2nd Announcement

Approaching New Interfaces



GSIA SSPI



DEVELOPMENT OF PREDNISOLONE ACETATE INCORPORATED MICROSPHERES BY SPRAY-DRYING TECHNIQUE

C. Sarisozen^a, S.Çalış^a, B. Arıca^a, A.Hıncal^a

^aDepartment of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University,
06100 Sıhhiye/Ankara, Turkey
E-mail: scalis@hacettepe.edu.tr

INTRODUCTION

Chitosan is a cationic polysaccharide obtained by deacetylation of chitin and is a hydrophilic, biocompatible and biodegradable biopolymer of low toxicity. On account of these properties chitosan is one of the most suitable biopolymer for formulations in pharmaceutical applications, especially for controlled drug delivery systems such as microspheres (1,4).

Prednisolone Acetate (PA) is a glucocorticoid that has 3 to 5 times more potency than hydrocortisone. Glucocorticoids have several functions including inhibition of inflammatory responses and cell proliferation. PA is practically insoluble in water and 1 in 120 soluble in alcohol. In this study PA was selected as a model drug.

The aim of our study was to investigate the effects of spray drying method on the characterization of the chitosan microspheres and release behavior of water insoluble drug (PA) from the microspheres.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Microspheres by Spray Drying

For the preparation of microspheres, 2³ factorial design was used. 1% and 0.5% chitosan aqueous solutions were prepared by dissolving chitosan free base in 1% lactic acid solution. PA was dissolved in the required amount of alcohol and added to the chitosan solutions such that PA weight corresponded to the 10% and 20 % of the weight of chitosan in the two solutions.

The final dispersions sprayed by Büchi 190 Mini Spray Dryer with standard 0.5 mm nozzle under the following conditions: inlet temperature 130 °C, outlet temperature 75°C, pump rate 5 ml/min.

Surface Morphology

For the investigation of surface shape and characteristics of the spray dried microspheres, SEM photographs was taken (JEOL JSM-6400)

Particle Size

Particle size of the microspheres was measured by SympaTec HELOS (HO728) particle size analyzer.

Drug Content Determination

PA determination was based on UV absorption at 243 nm in alcohol using Agilent UV Spectrophotometer (Hewlett Packard). PA incorporated in the microspheres was determined after ultrasonication the microspheres in alcohol for 1 hour.

In Vitro Drug Release

In vitro release of PA from chitosan microspheres was examined in PBS 7.4 containing 0.5% sodium lauryl sulfate and 0.05% sodium azide. 5 mg of microspheres were put in Eppendorf tubes and then 1.25 ml of medium was added. The formulations were shaken in a horizontal shaker at 50 rpm, at 37°C. At the appropriate time points, samples were taken and centrifuged, then the supernatant was analyzed spectrophotometrically at 247 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Spray drying is a well known process that has many advantages for the preparation of microspheres. This method is a rapid high yield technique and one step process which enables small microspheres with smooth surface and spherical shape (2).

As seen in SEM images in Fig.1, microspheres of spherical shape and smooth surface were obtained regardless of the chitosan and PA concentration. When spray drying technique was used for the preparation of the microspheres SEM images showed that microspheres usually have sizes smaller than 10µm and mean particle sizes are about 5µm. But data obtained from particle size analyzes revealed that the microspheres generally have bigger diameters than SEM photography data (Table 1).

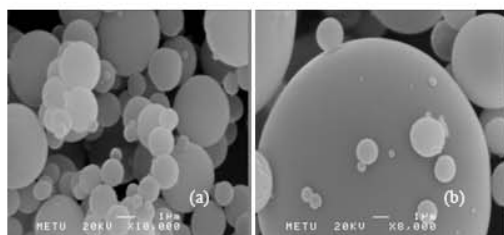


Fig.1. The SEM photographs of chitosan microspheres; (a)1CM Empty (b) 1CM10PA

Particle analyzes data showed us no conclusions could be derived because particle sizes do not follow any homogenous tendency. Due to the electrostatic properties of the microspheres they might have formed agglomerates as seen in SEM photos too, and this might have caused the dissimilar results between the SEM and particle size analyze data.

As seen in Table 1, the production yields of microspheres were higher when the polymer concentration was increased in which PA concentration was constant. Also at the opposite conditions, same results were found, production yield increased with increasing the PA concentration while the polymer concentration was constant. As expected, the maximum yield was obtained by 1CM20PA formulation which has the high levels of the two factors, 1% chitosan concentration and 20% PA concentration.

Encapsulation efficiencies of the prepared formulations were between 5.12% and 45.7%. The highest value obtained from 1CM20PA formulation and the lowest from 0.5CM10PA which consist of 0.5% chitosan and 10% PA concentration. These results of encapsulation efficiency analyzes were in consistency with the results of the production yield analyzes as mentioned above. With increasing both polymer and PA concentration, it was possible to prepare the formulation with the highest PA content.

Table 1. Characteristics of the spray dried chitosan microsphere formulations

Formulation	Production Yield (%)	Encapsulation Efficiency(%)	Mean Particle Size(μm)
0.5CM10PA	21.6	5.12	10.6
1CM10PA	43.9	40	8.86
0.5CM20PA	35	30	5.10
1CM20PA	48	45.7	10.41

In order to evaluate the release behaviour of PA from the microspheres in vitro release study was performed.

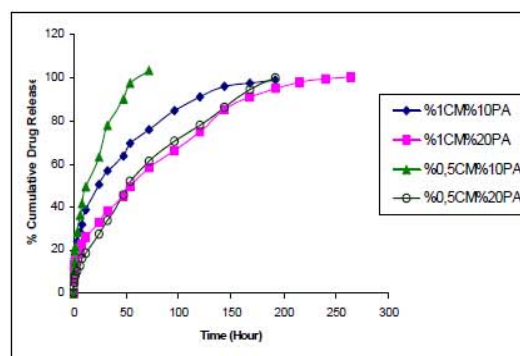


Fig. 2. Cumulative release of PA from the microsphere formulations

As shown in the Fig.2 all of the release profiles were similar and a burst effect was seen in all formulations. The 0.5CM10PA formulation released 41% of its PA content in first 8 hours and 100% of PA in 3 days. As expected from the results of encapsulation efficiencies, the longest release was observed from the 1CM20PA which released all of its PA content in 11 days. Increased polymer concentration resulted more sustained release of PA, because chitosan was a hydrophilic polymer and when chitosan microspheres immersed in aqueous solutions they swelled and formed a gel diffusion layer slowing the drug release (3).

CONCLUSIONS

With spray drying method, the microspheres containing prednisolone acetate that had smooth surfaces and good sphericity were produced. Increased PA concentration in the microsphere formulations increased both product yield and encapsulation efficiency. Also, chitosan microspheres provided sustained release of the water insoluble model drug PA up to 11 days.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors wish to acknowledge Abdi İbrahim (Turkey) for the generous supply of PA. This study was supported by Hacettepe University Research Fund (Project No:0302301007).

REFERENCES

- 1) P He et al. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int J Pharm* 187: 53-65, 1999
- 2) P Giunchedi et al. Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. *Eur J Pharm and Biopharm*, 53:233-239, 2002
- 3) L Filipovic-Grcic et al. Spray dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterization. *J Pharm and Pharmacol*, 55: 921-931, 2003.
- 4) Arica, B., Çalış, S., Kaş, H.S., Hıncal, A.A. "Chitosan Microspheres of Ibuprofen: Evaluation and In Vitro Characterization" in *Chitosan in Pharmacy and Chemistry*, p. 71-76, R.A.A. Muzzarelli and C. Muzzarelli (Eds) Atec, Italy, 2002.



GPEN 2006

THE UNIVERSITY OF KANSAS

Call For Abstracts



GPEN 2006 | October 25-27

The University of Kansas
Department of Pharmaceutical Chemistry
Lawrence, Kansas, USA

Submit your abstract via email to:

GPEN2006@ku.edu

Submission Deadline: **May 19, 2006**

Important: Please submit abstracts as MS Word documents or Adobe PDF file and indicate whether it is for an oral or poster presentation.





Globalization of Pharmaceuticals Education Network

Administration

By-Laws

Contact Information

GPEN Meetings

Member Institutions

Travel Grant Program

Globalization of Pharmaceuticals Education Network (GPEN), Inc.

GPEN, Inc. was founded in 1998 by the Department of Pharmaceutical Chemistry at The University of Kansas (Lawrence, KS) in cooperation with several educational institutions in Europe and Asia. The rationale for creating GPEN, Inc. was based on the fact that pharmaceutical and biotechnology companies, which hire the graduates of these educational institutions, had become highly globalized. Therefore, the founders of GPEN, Inc. felt that graduate students and postdoctoral fellows being trained at their institutions needed increased exposure to science and culture at an international level.

GPEN, Inc. was created for the sole purpose of fostering and facilitating international scientific exchange in the following areas of the pharmaceutical sciences:

- physical pharmacy
- bioanalysis
- animal and human biopharmaceutics, pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenomics
- cellular and molecular biopharmaceutics
- drug delivery
- drug targeting
- pharmaceutical biotechnology
- pharmaceutical engineering
- materials science
- computational and modeling approaches drug formulation and delivery.

Educational institutions holding membership in GPEN, Inc. have demonstrated research excellence in one or more of these areas of the pharmaceutical sciences. In addition, these institutions have a proven commitment to the training of predoctoral students and postdoctoral fellows for careers in universities, government institutions and pharmaceutical and biotechnology companies.

GPEN, Inc. specifically sponsors biannual meetings designed to foster and facilitate international scientific exchange in the pharmaceutical sciences:

- GPEN, Inc. works closely with host institutions in the organization of international meetings of the faculty, graduate students and postdoctoral fellows from the participating educational institutions. These meetings include two days of scientific presentations by graduate students and postdoctoral fellows and one day of short courses taught by the participating faculty. Selected industrial representatives are invited as observers. To date, GPEN, Inc. has sponsored the following meetings at the indicated universities:

- GPEN1998, The University of Kansas, Lawrence, KS
- GPEN1998, ETH, Switzerland
- GPEN2000, Uppsala University, Uppsala, Sweden
- GPEN2002, University of Michigan, Ann Arbor, MI
- GPEN2004, Kyoto University, Kyoto, Japan

The next GPEN Meeting (GPEN2008) will be held at The University of Kansas, Lawrence, Kansas on October 25-27, 2008.

June 12, 2006
2095 Constant Ave.
Lawrence, KS 66047

Can Sarisozen
Hacettepe University, Faculty of Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
06100 Ankara, Turkey

Dear Can Sarisozen:

I am pleased to inform you that your abstract entitled Prednisolone Acetate-Eluting Novel Biodegradable Vascular Stents For Implantation has been accepted for an oral presentation at the GPEN meeting to be held at the University of Kansas in Lawrence, Kansas, on October 25-27, 2006. You will be contacted at a later date to inform you of the details regarding the day and time of your presentation, along with instructions for preparing and submitting your presentation when you arrive in Lawrence. Thank you for your submission, and I look forward to meeting you in October.

Sincerely,



Eric Gorman
Podia Chair of the 2006 GPEN Organizing Committee

PREDNISOLONE ACETATE-ELUTING NOVEL BIODEGRADABLE VASCULAR STENTS FOR IMPLANTATION

Sarisozen, C., Arica, B., Calis, S., Hincal, A.A.

Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology 06100 Ankara, Turkey

Purpose. To investigate the possibility of Prednisolone Acetate (PA) and PA-loaded chitosan microspheres for cardiovascular implantation by biodegradable polymer-based stents which could behave as a controlled release drug delivery system.

Methods. The preparation and the characterization of PA loaded chitosan microspheres have been studied using 2² factorial design. Spray drying technique was used for the preparation of chitosan microspheres. Chitosan microspheres were formulated by using low and medium molecular weight chitosan at two different PA concentrations. The optimum chitosan microsphere formulation determined was applied to both types of stent formulations. PLGA 75:25 and PLGA 50:50 were used for preparing the helical stents which were manufactured from solution-cast biodegradable polymeric films. The characteristics of the stents, such as wall thickness, diameter, length and morphology were evaluated while in vitro release studies were performed in PBS at pH 7.4.

Results. The outer dimension and the length of the stents prepared were measured as approximately 3 mm and 1.5 cm, respectively. The physical structure of the stents was not affected by the incorporation of the drug or drug loaded microspheres. Although PA release from the stents seemed to be very slow following the initial release period through about 1-5 days in PBS buffer, a significant amount of the drug has been determined to be released at the second release period of 5 and 30 days, which might be explained by the slow degradation of the PLGA polymer in the release medium. Nevertheless, approximately 3.5-16% of the PA from the PA-loaded stents and 6-13% of the PA from the chitosan microspheres containing stents were released in 30 days.

Conclusions. The proposed system could be used as a drug-releasing reservoir at the site of action. However, further in vitro and in vivo studies are needed in order to demonstrate the biocompatibility of such stents and to clarify the applicability of the proposed approach for the controlled drug delivery and implantation.

20th Anniversary
aaps

Celebrating Volunteers
and Successful Careers
American Association of
Pharmaceutical Scientists

Call For Papers

2006 AAPS Annual Meeting and Exposition

October 29–November 2, 2006 | Henry B. Gonzalez Convention Center | San Antonio, TX



Visit:

www.aapspharmaceutica.com/annualmeeting
to submit your abstract today!

Submission Deadline: May 9, 2006

 Group Registration
Discounts Available!

Call For Papers
funded by a grant from **aptuit**

2006 AAPS ANNUAL MEETING and EXPOSITION KABUL YAZISI

Konu	RE: ABSTRACT NOTIFICATION
Ä°Ãşin	► Annette Williams <WilliamsA@aaps.org>
Tarih	Pazartesi, Haziran 26, 2006 9:44 ÃŦs
Kime	can@hacettepe.edu.tr

Congratulations, your submission, “**Development of Biodegradable Polymeric Cardiovascular Stents and In Vitro Evaluation**”, has been selected for presentation at the 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition. Thank you for supporting for the Pharmaceutics and Drug Delivery (PDD) Section of the 2006 AAPS Annual Meeting and Exposition. Additional instructions will be provided as the information becomes available.

Annette Williams
Abstract Technology Manager
American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)
2107 Wilson Boulevard, Suite 700
Arlington, VA 22201-3042
WilliamsA@aaps.org
703-248-4792
Fax: 703-243-5582

Development of Biodegradable Polymeric Cardiovascular Stents and In Vitro Evaluation

Sarisozen C., Arica B., Calis S., Hincal, A.A.

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

Purpose. To develop biodegradable polymeric cardiovascular stents and evaluation of their in vitro drug release and characteristics. **Methods.** Stents were prepared from solution-cast biodegradable polymeric films. For this purpose, two types of biopolymer (PLGA 75:25 and PLGA 50:50) were dissolved in dichloromethane separately to have a final concentration of 25% (w/v) in which PEG 4000 was added as a plasticizer. The polymer solutions cast onto the aluminum pans in 3x2 cm area. After evaporation of dichloromethane, the polymer films were cut into strips and coiled on the cylindrical rods to form a helical shaped stents. A model drug Prednisolone Acetate (PA) was incorporated into the stents. Two types of stents were developed: a polymer film including PA and a polymer film including PA containing spray-dried chitosan microspheres. The characteristics of stents such as wall thickness, diameter, length, morphology were evaluated and in vitro release studies were performed in PBS at pH 7.4 containing 0.5% sodium lauryl sulphate and 0.05% sodium azide. **Results.** The prepared stents had outer diameters approximately 3mm and the length was 1.5cm. The polymer wall thickness was $136\mu\text{m}\pm 0.05$ for empty stents. Incorporation of drug or drug loaded microspheres did not interfere during the formation of homogenous films and helical stent structure. PA and chitosan microsphere containing stents release profile were characteristic with a burst followed by a slow release. The biodegradable cardiovascular stents containing PA and microspheres preserved their helical shape and mechanical strength in the release media even on the 28th day. The PA release from the PLGA 50:50 stents was faster because of the more hydrophilic character of the polymer. At 28th day, the cumulative release of PA was 3.29% and 3.45% from the stents of PLGA 75:25 and PLGA 75:25 containing microspheres, respectively. However, PA release was 9.81% and 11.37% from PLGA 50:50 and PLGA 50:50 containing microspheres. **Conclusions.** Both types of biodegradable polymeric stents could be used to deliver the drug while providing structural integrity and controlled release of the drug.

EK 2: TRANSKRIPT



TRANSKRİPT

Sayı: B.30.2-HAC.0.A1.00.00- 754

18.09.2006

Adı Soyadı: CAN SARISÖZEN

No: 2312029

Doğum Yeri,Tarihi: Ankara,11/4/1981

SON MEZUN OLDUĞU

Üniversite: Hacettepe Üniversitesi Fak./Y.O./Ens.: Eczacılık

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ PROGRAMLARI

Anabilim Dalı:	Farmasötik Teknoloji	Programı:	Farmasötik Teknoloji
Kayıt Tarihi:	6/10/2003	Durumu:	Öğrenime Devam Etmektedir
Statüsü:	Yüksek Lisans	Kazanılan Puan:	98.50
Genel Akad. Ortalama:	3.94	Kazanılan Kredi:	25

Akademik Dönem : 2003/2004 GÜZ

		Teo.	Pra.	Kre.	Not	Katsayı	Puan
BİS 535	Biyoistatistik	3	0	3	A2	3,5	10.5
EFK 523	İleri Enstrümantasyon	3	4	4	A1	4	16
EFT 614	Pepdid/Protein İlaçları Taşıyıcı Sistem,Kulla.Biyolojik Parçalana Polimerler	2	0	2	A1	4	8
EFT 666	Patent Hakları Uygulamaları Ve İlaç Endüstrisi	3	0	3	A1	4	12
Dönem Kredisi:	12						

Akademik Dönem : 2003/2004 BAHAR

		Teo.	Pra.	Kre.	Not	Katsayı	Puan
BİS 621	Deney Planlaması	3	0	3	A1	4	12
EFK 637	İlaç Analizlerinde Kromatografik Yöntemler	3	0	3	A1	4	12
EFT 641	İlaç Taşıyıcı Yeni Sistemler	2	4	2	A1	4	8
EFT 652	Makromoleküllerin Formülasyon, Tasarım Ve Taşınması	3	0	3	A1	4	12
FTE 4090	Biyoyararlanım Ve Biyoeşdeğerlik	2	0	2	A1	4	8
Dönem Kredisi:	13						

Akademik Dönem : 2004/2005 GÜZ

		Teo.	Pra.	Kre.	Not	Katsayı	Puan
EFT 600	Tez Konusu Belirlendi	4	0	0	-	0	0
EFT 692	Özel Konular	0	2	0	G	0	0
	Farmasötik Teknoloji Seminerleri I						
Dönem Kredisi:	0						

Akademik Dönem : 2004/2005 BAHAR

		Teo.	Pra.	Kre.	Not	Katsayı	Puan
EFT 600	Özel Konular	4	0	0	-	0	0
Dönem Kredisi:	0						

Akademik Dönem : 2005/2006 GÜZ

		Teo.	Pra.	Kre.	Not	Katsayı	Puan
EFT 600	Özel Konular	4	0	0	-	0	0
Dönem Kredisi:	0						

Not Sistemi (Yüksek Lisans)

Puan	Not- Derece	Kat Sayı
90 - 100	A1 - Pekiyi	4.00
85 - 89	A2 - Pekiyi	3.50
75 - 84	B1 - İyi	3.00
70 - 74	B2 - İyi	2.50
65 - 69	C - Orta	2.00
0 - 64	F3 - (Geçmez)	
	G - (Kredisiz Geçer)	
	K - (Kredisiz Geçmez)	

Not Sistemi (Doktora)

Puan	Not- Derece	Kat Sayı
90 - 100	A1 - Pekiyi	4.00
85 - 89	A2 - Pekiyi	3.50
75 - 84	B1 - İyi	3.00
70 - 74	B2 - İyi	2.50
65 - 69	C - (Geçmez)	2.00
0 - 64	F3 - (Geçmez)	
	G - (Kredisiz Geçer)	
	K - (Kredisiz Geçmez)	



Akademik Dönem : 2005/2006-BAHAR

EFT 600

Özel Konular

Dönem Kredisi: Yarıyıl Devam etmektedir.

Teo. Pra. Kre. Not Katsayı Puan

4 0 0 - - -

Danışmanı: Prof. Dr. Sema Çalış

Tez Konusu: Anjioplastide Kullanılmak Üzere Biyoparçalanabilir İmplantların Formülasyonlarının Geliştirilmesi Ve İn Vitro Değerlendirilmelerine İlişkin Çalışmalar

Tez Konusu Kabul Tarihi: 13/12/2004

(t : Özel öğrencilikten transfer edilen dersler)

Not : Öğrenci öğrenimi süresince disiplin cezası almamıştır.

Prof.Dr. Haviye NAZLIEL
Müdür Yardımcısı

Not Sistemi (Yüksek Lisans)

Puan	Not- Derece	Kat Sayı
90 - 100	A1 - Pekiyi	4.00
85 - 89	A2 - Pekiyi	3.50
75 - 84	B1 - İyi	3.00
70 - 74	B2 - İyi	2.50
65 - 69	C - Orta	2.00
0 - 64	F3 - (Geçmez)	
	G - (Kredisiz Geçer)	
	K - (Kredisiz Geçmez)	

Not Sistemi (Doktora)

Puan	Not- Derece	Kat Sayı
90 - 100	A1 - Pekiyi	4.00
85 - 89	A2 - Pekiyi	3.50
75 - 84	B1 - İyi	3.00
70 - 74	B2 - İyi	2.50
65 - 69	C - (Geçmez)	2.00
0 - 64	F3 - (Geçmez)	
	G - (Kredisiz Geçer)	
	K - (Kredisiz Geçmez)	