

AYÇA YILDIZ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2006

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**HEPARİN MİKROKÜRELERİNİN HAZIRLANMASI VE
AKCİĞERLERE HEDEFLENMESİ**

UZM. ECZ. AYCA YILDIZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. AHMET ARAMAN**

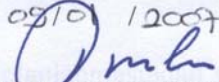
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek lisans / Doktora. Tezi olarak kabul edilmiştir.

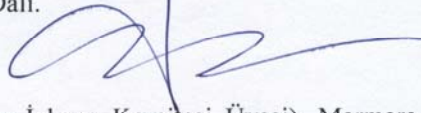
09/10 / 2007


Prof. Dr. Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (x)
Anabilim Dalı : Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Ayca Yıldız
Tez Başlığı : Heparin Mikrokürelerinin Hazırlanması ve Akciğerlere Hedeflenmesi
Sınav Yeri : Eczacılık Fakültesi B Blok Seminer Salonu
Sınav Tarihi : 22.12.2006

Tez Sınav Jürisi

1. Prof. Dr. Ahmet Araman (Tez Danışmanı), İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı.



2. Prof. Dr. Betül Dortunç (Tez İzleme Komitesi Üyesi), Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı.



3. Prof. Dr. Yıldız Özsoy-Erginer (Tez İzleme Komitesi Üyesi), İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı.



4. Prof. Dr. Nazan Bergişadi, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı.



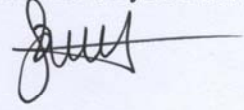
5. Yrd. Doç. Dr. Sevgi Güngör, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Uzm. Ecz. Ayca Yıldız



Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim sırasında tezimin yönetilmesi ve çalışmalarımın yönlendirilmesinde her zaman yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Ahmet Araman'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgisiyle bana destek olan ve bilimsel bakış açısı kazanmamı sağlayan Doç. Dr. Yıldız Özsoy a teşekkürlerimi iletirim.

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nazan Bergişadi ye desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmamın Cardiff Üniversitesi Welsh School of Pharmacy de gerçekleştirilen kısmında her türlü desteği eksik etmeyen, bilimsel çalışma vizyonunu veren Dr. Mark Gumbleton a, yardımcı danışmanım James Birchall e ve laboratuvar arkadaşlarım Mathew Smith, Christopher Morris e sonsuz teşekkürlerimi iletirim.

İn vivo çalışmalarımında yardımcı olan Cardiff Üniversitesi Welsh School of Pharmacy Farmakoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr.Ken Broadley ve Elinor John a teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Anabilim Dalımız araştırma görevlisi arkadaşlarıma;

Tüm yaşamım boyunca her türlü desteği sağlayan ve daima yanımda olan değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Avrupa Birliği 6. Çerçeve Programı Marie Curie ön aşama eğitimi altında yer alan Galenos Network bursu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XIII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVII
ÖZET	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
GİRİŞ VE AMAÇ.....	20
GENEL BİLGİLER	23
1. HEPARİN HAKKINDA GENEL BİLGİLER	23
1.1. Teşhisi.....	24
1.1.1. Kağıt Kromotografisi	24
1.1.2. İnce Tabaka Kromotografisi (İTK).....	24
1.1. Miktar Tayini	24
1.2.1. Metakromaziye Dayanan Yöntem	24
1.2.2. Diğer Yöntemler	25
1.3. Stabilitesi	26
1.4. Farmakolojik Özellikleri.....	26
1.5. Farmakokinetik Özellikleri.....	26
1.6. Heparinin Alternatif Kullanım Yolları	27
1.6.1. Parenteral Yoldan Uygulanması	28
1.6.2. Oral Yoldan Uygulanması	29
1.6.3. Nazal Yoldan Uygulanması.....	29
1.6.4. Transdermal Yoldan Uygulanması	30
1.6.5. Rektal Yoldan Uygulanması.....	30
1.6.6. Pulmoner Yoldan Uygulanması.....	30
1.7. Yan Etkileri.....	32
1.8. Farmasötik Preparat Şekilleri.....	32

2. MİKROKÜRELER.....	32
2.1. Tanımı.....	32
2.2. Özellikleri	33
2.3. Hazırlama Yöntemleri.....	33
2.3.1. Püskürterek Kurutma Yöntemi	33
2.3.2. Çözücü Buharlaştırma Yöntemi.....	37
2.3.3. Polimerizasyon Yöntemleri	37
2.3.4. Faz ayrımı (Koaservasyon) Yöntemi	38
2.3.5. Dispers Fazda Jelleşme ve Çapraz Bağlanma Yöntemi.....	38
2.3.6. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) Yöntemi	39
2.3.7. Sıvılaştırılmış Yatakta Kaplama Yöntemi	39
2.4. Mikroküre Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	39
2.5. PLA, PLGA ve Laktit/Glikolit Kopolimerleri ile Yapılan Çalışmalar	41
2.6. Mikrokürelerin Kullanım Alanları.....	43
2.7. Heparin İçeren Partiküler Sistemler.....	44
3. PULMONER YOL İLE İLAÇ UYGULANMASI.....	46
3.1. Solunum Yolu Anatomisi ve Fizyolojisi	46
3.2. Solunum Yolu Hastalıkları	47
3.2.1. Havayolu Aşırı Cevaplılığı (Bronşiyal Aşırı Hassasiyeti):.....	47
3.2.2. Kullanılan İlaçlar	50
3.3. Pulmoner Yol ile İlaçların Uygulanması ve Emilim Mekanizmaları	51
3.4. Akciğere İlaç Uygulamasındaki Yaklaşımlar	52
3.5. Pulmoner İlaç Uygulama Sistemleri	53
3.5.1. Ölçülü Doz İnhaler (ÖDİ).....	54
3.5.2. Kuru Toz İnhaler (KTİ)	55
3.5.3. Nebulizörler	55
4. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	56
4.1. Hücre Kültürü Tanım ve Yöntemleri.....	56
4.2. Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları	61
I-GEREÇ.....	63
Kimyasal Madde ve Çözücüler.....	63
Aletler	64
II-YÖNTEM	67

1. Heparin Üzerinde Yapılan Çalışmalar	67
1.1. Infrared (IR) Spektrumu	67
1.2. Ultraviyole (UV) Spektrumu	67
1.3. Erime Derecesi Tayini	67
1.4. Heparinin Termal Analizi	67
1.5. Miktar Tayini	67
1.5.1. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu.....	68
1.5.1.1. Doğrusallık.....	68
1.5.1.2. Kesinlik.....	68
1.5.1.3. Doğruluk	69
1.5.1.4. Seçicilik	69
2. Mikrokürelerin Hazırlanması Üzerine Yapılan Çalışmalar	69
2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	69
2.2. Heparin İçeren Mikrokürelerin Hazırlanması.....	72
2.3. Hazırlanan Mikroküreler Üzerinde Yapılan Çalışmalar.....	72
2.3.1. Mikrokürelerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	72
2.3.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi	72
2.3.3. Mikrokürelerin Termal Analizi.....	72
2.3.4. Mikrokürelerin Etkin Madde Tutma Kapasitesi ve Mikroküre Verimi.....	73
2.3.5. Mikrokürelerden İn Vitro Heparin Salımı Çalışmaları.....	73
2.3.6. Zeta Potansiyel Ölçülmesi	74
2.3.7. İn Vivo Çalışmalar	75
2.3.7.2. Yöntem.....	75
2.3.7.3. Hassaslaştırma	75
2.3.7.4. Ovalbumin Hassaslaştırması.....	75
2.3.7.5. Histamin Çemberi	77
2.3.7.6. sGaw Ölçümü	77
2.3.7.7. Bronkoalveolar Lavaj	78
2.3.8. Eozinofil Katyonik Protein Analiz Yöntemi	79
2.3.9. İn Vivo Deneysel Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi	79
2.3.10. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	80
2.3.10.1. Hücre Kültürü	80
2.3.10.2. Transepitel Elektrik Direnci.....	80

2.3.10.3. PLGA Mikrokürelerin İnsan Trakeal Bronşiyal Hücrelerinde Geçirgenlik Üzerine Etkisi	80
2.3.10.4. Hücre Toksisitesi Çalışmaları	82
2.3.10.4.1 Tripan Mavisi Yöntemi.....	82
2.3.10.4.2. 3-[4,5-Dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) Yöntemi.	83
BULGULAR.....	85
1.Heparin Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	85
1.1. Infrared (IR) Spektrumu	85
1.2. Ultraviyole (UV) Spektrumu	85
1.3. Erime Derecesi Tayini	86
1.4. Heparinin Termal Analizine Ait Bulgular	86
1.5. Heparinin Miktar Tayinine Ait Bulgular	87
1.5.1. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu.....	87
1.5.1.1. Doğrusallık.....	87
1.5.1.2. Kesinlik.....	88
1.5.1.3. Doğruluk.....	88
1.5.1.4. Seçicilik	89
2. Mikrokürelerin Hazırlanması Üzerine Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	89
2.1. Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	89
2.2. Mikroküreler Üzerinde Yapılan Kontrollere Ait Bulgular	90
2.2.1. Mikrokürelerin Yüzey Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular	90
2.2.2. Mikrokürelerin Partikül Büyüklüğü Dağılımına Ait Bulgular	95
2.2.3. Mikrokürelerin Termal Analizine Ait Bulgular.....	104
2.2.4. Mikrokürelerin Etkin Madde Tutma Kapasitesi ve Mikroküre Verimine Ait Bulgular	106
2.2.5. Mikrokürelerden İn vitro Heparin Salımı Çalışmalarına Ait Bulgular.....	107
2.2.6. Zeta Potansiyel Ölçümüne Ait Bulgular.....	113
2.2.7. İn vivo Çalışmalara Ait Bulgular.....	116
2.2.8. Eozinofil Katyonik Protein Analiz Yöntemine ait Bulgular.....	121
2.2.9. İn Vivo Deney Sonuçlarını İstatistiksel Değerlendirilmesine Ait Bulgular	121
2.2.10. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	122
2.2.10.1. Transepitel Elektrik Direncine Ait Bulgular.....	122

2.2.10.2. PLGA Mikropartiküllerin İnsan Trakeal Bronşiyal Hücrelerinde Geçirgenlik Üzerine Etkisine Ait Bulgular.....	123
2.2.10.3. Hücre Toksikitesi Çalışmalarına Ait Bulgular.....	124
2.2.10.3.1. Tripan Mavisini Yöntemine Ait Bulgular.....	124
2.2.10.3.2. 3-[4,5-Dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) Yöntemine Ait Bulgular.....	125
TARTIŞMA.....	129
HAM VERİLER.....	164
ÖZGEÇMİŞ.....	194

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Biyolojik olarak parçalanmayan hidrojel	40
Tablo 2: Biyolojik olarak parçalanabilen doğal ve sentetik polimerler	41
Tablo 3: Havayolu inflamasyonuna katılan inflamatuvar hücreler, bu hücrelerden salınan inflamatuvar mediatörler ve inflamatuvar sürecin havayolundaki hücrelere etkileri	50
Tablo 4: Havayolu aşırı duyarlılığında kullanılan ilaçlar	51
Tablo 5: Hücre kültürü besiyerinin bileşenleri (Memeli hücresi için) (207)	58
Tablo 6: Yaygın olarak kullanılan hücre serileri (203)	60
Tablo 7: Diklormetan ile hazırlanan heparin mikroküre formülasyonları (D1-D9)	71
Tablo 8: Etil asetat ile hazırlanan heparin mikroküre formülasyonları (E1-E9)	71
Tablo 9: Calu-3 Hücre Dizini	81
Tablo 10: Heparinin standart eğrisine ait bulgular	88
Tablo 11: Heparinin miktar tayininde kullanılan yöntemin doğruluğuna ait bulgular	89
Tablo 12: Püskürterek kurutma aleti ile çalışma parametreleri	89
Tablo 13: Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerin (D1-D9) ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılımına ait bulgular	96
Tablo 14: Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerin (E1-E9) ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılımına ait bulgular	96
Tablo 15: Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerin (D1-D9) foton korelasyon spektroskopisi ile partikül büyüklüğü dağılımına ait bulgular	97
Tablo 16: Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerin (E1-E9) foton korelasyon spektroskopisi ile partikül büyüklüğü dağılımına ait bulgular	97
Tablo 17: DCM ile hazırlanan mikrokürelerin etkin madde tutma kapasitesi ve verimine ait bulgular	106
Tablo 18: Et-Ac ile hazırlanan mikrokürelerin etkin madde tutma kapasitesi ve verimine ait bulgular	107
Tablo 19: Diklormetan ile hazırlanan heparin mikrokürelerinin in vitro salım çalışmasına ait bulgular (n=3)	108
Tablo 20: Etil asetat ile hazırlanan heparin mikrokürelerinin in vitro salım çalışmasına ait bulgular (n=3)	109

Tablo 21: DCM ile hazırlanan mikrokürelerin zeta potansiyel değerlerine ait bulgular	113
Tablo 22: Et-Ac ile hazırlanan mikrokürelerin zeta potansiyel değerlerine ait bulgular	114
Tablo 23: Poli-L-Arjinin / heparin ve Poli-L-Arjinin / heparin yüklü mikroküre çözeltilerine ait zeta potansiyel değerleri.....	115
Tablo 24: Serum fizyolojik, heparin çözeltisi (x2), heparin çözeltisi (x5) ve heparin yüklü mikroküre (x2) uygulamasını takiben kobayların Ovalbumin ile hassaslaştırılmasından önce ve sonra histamin uygulanmasını takiben 0.5, 5 ve 10. dakikalarda sGaw değişimine ait bulgular.....	117
Tablo 25: Ovalbumin ile hassaslaştırılmış ve histamin uygulanmış hayvanlarda serum fizyolojik, heparinx2, heparinx5 ve heparin yüklü mikroküre nebulizasyonu sonucu alerjik hücre sayımına ait bulgular.....	120
Tablo 26: GLM kullanılarak yapılan in vivo istatistiksel değerlere ait bulgular.....	121
Tablo 27: GLM ile yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait bulgular	122
Tablo 28: İn vivo değerlerin Dunnet Simultaneous Test ile istatistiksel değerlendirmesine ait bulgular.....	122
Tablo 29: PLGA mikroküreleri ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinden radyoaktif işaretlenmiş sukroz ve diazepam geçirgenlik katsayılarına ait veriler	123

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Solunum yolu anlatımı	46
Şekil 2: Püskürterek kurutma aleti.....	70
Şekil 4: Pletsimograf aletine ait fotoğraf	77
Şekil 5: ImmunoCAP® aletine ait şekil.....	79
Şekil 6: Transwell üzerindeki Calu-3 hücrelerinin geçirgenlik çalışmasının şematiği ..	82
Şekil 7: MTT yöntemine ait fotoğraf.....	83
Şekil 8: Heparine ait IR spektrumu.....	85
Şekil 9: Heparinin Azur A ile verdiği UV spektrumu	86
Şekil 10: Heparinin DSC termogramı.....	87
Şekil 11: Heparinin UV spektrofotometrik yöntemine ait standart eğrisi	87
Şekil 12: D1 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	90
Şekil 13: D2 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	90
Şekil 14: D3 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	90
Şekil 15: D4 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	90
Şekil 16: D5 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	91
Şekil 17: D6 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	91
Şekil 18: D7 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	91
Şekil 19: D8 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	91
Şekil 20: D9 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	91
Şekil 21: E1 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	91
Şekil 22: E2 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	92
Şekil 23: E3 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	92
Şekil 24: E4 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	92
Şekil 25: E5 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	92
Şekil 26: E6 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	92
Şekil 27: E7 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	92
Şekil 28: E8 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	93
Şekil 29: E9 Mikroküre Formülasyonu ışık mikroskobu fotoğrafı.....	93
Şekil 30: D1 Formülasyonunun taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü.....	93
Şekil 31: D3 Formülasyonunun taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü.....	94
Şekil 32: E1 Formülasyonunun taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü	94

Şekil 33: E3 Formülasyonunun taramalı elektron mikroskobundaki görüntüsü	95
Şekil 34: D1 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	98
Şekil 35: D2 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profile.....	98
Şekil 36: D3 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	98
Şekil 37: D4 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	99
Şekil 38: D5 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	99
Şekil 39: D6 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	99
Şekil 40: D7 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	100
Şekil 41: D8 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profile.....	100
Şekil 42: D9 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	100
Şekil 43: E1 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	101
Şekil 44: E2 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	101
Şekil 45: E3 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	101
Şekil 46: E4 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	102
Şekil 47: E5 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	102
Şekil 48: E6 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	102
Şekil 49: E7 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	103

Şekil 50: E8 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	103
Şekil 51: E9 Mikrokürelerinin ışık saçılımı yöntemi ile partikül büyüklüğü dağılım profili	103
Şekil 52: Polimere ait DSC termogramı	104
Şekil 53: Boş mikrokürelere ait DSC termogramı	105
Şekil 54: Heparin yüklü mikroküreler ait DSC termogramı	105
Şekil 55: D1-D3 mikrokürelerine ait kümülatif heparin miktarı salım grafiği	110
Şekil 56: D4-D5 mikrokürelerine ait kümülatif heparin miktarı salım grafiği	110
Şekil 57: D7-D9 mikrokürelerine ait kümülatif heparin miktarı salım grafiği	111
Şekil 58: E1-E3 mikrokürelerine ait kümülatif heparin miktarı salım grafiği	111
Şekil 59: E4-E6 mikrokürelerine ait kümülatif heparin miktarı salım grafiği	112
Şekil 60: E7-E9 mikrokürelerine ait kümülatif heparin miktarı salım grafiği	112
Şekil 61: Poli-L-arjinin / heparin (▲), poli-L-arjinin / heparin mikropartikül (■) çözeltilerine ait zeta potansiyel profili	115
Şekil 62: Serum fizyolojik (A), heparin çözeltisi (x2) (B), heparin çözeltisi (x5) (C) ve heparin yüklü mikroküre (x2) (D) uygulamasını takiben kobayların ovalbumin ile hassaslaştırılmasından önce (■) ve sonra (■) histamin uygulanması takiben sGaw değişimine ait histogram	116
Şekil 63: Serum fizyolojik nebülize edilmiş kobaylarda ovalbumin hassasiyeti öncesi (●) ve sonrası (●) histamin uygulanmasını takiben %sGaw değişimi	118
Şekil 64: Heparin çözeltisi (5000IU/kg) (x2) nebülize edilmiş kobaylarda ovalbumin hassasiyeti öncesi (●) ve sonrası (●) histamin uygulanmasını takiben %sGaw değişimi	118
Şekil 65: Heparin çözeltisi (5000IU/kg) (x5) nebülize edilmiş kobaylarda ovalbumin hassasiyeti öncesi (●) ve sonrası (●) histamin uygulanmasını takiben %sGaw değişimi	119
Şekil 66: Heparin yüklü mikroküre (5000IU/kg) (x2) nebülize edilmiş kobaylarda ovalbumin hassasiyeti öncesi (●) ve sonrası (●) histamin uygulanmasını takiben %sGaw değişimi	119
Şekil 67: Serum fizyolojik, heparinx2, heparinx5 ve heparin yüklü mikroküre nebülizasyonu sonucu ovalbumin ile hassaslaştırılmış ve histamin uygulanmış	

hayvanların bronkoalveolar lavaj sıvısında yapılan alerjik hücre sayımına ait histogram	120
Şekil 68: Serum fizyolojik , heparinx2, heparinx5 ve heparin yüklü mikroküreler ile tedavi edilmiş kobayların bronkoalveolar lavaj sıvısında yapılan eozinofil katyonik protein miktar tayinine ait histogram.....	121
Şekil 69: Calu-3 hücrelerinin TEER değerlerine ait zamana bağlı profil.....	123
Şekil 70 : Serum fizyolojik, heparinx5 ve heparin yüklü mikroküreler ile tedavi edilmiş kobaylardan alınan serumun Calu-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine ait histogram	124
Şekil 71. Serum fizyolojik, heparinx5 ve heparin yüklü mikroküreler ile tedavi edilmiş kobaylardan alınan serumun (5IU heparin ilave edilen) Calu-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine ait histogram	124
Şekil 72 : Serum fizyolojik, heparinx5 ve heparin yüklü mikroküreler ile tedavi edilmiş kobaylardan alınan serumun (10 IU heparin ilave edilen) Calu-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine ait histogram	125
Şekil 73: Serum:DMEM (1:1) çözeltisi ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen absorbanlarına ait histogram	125
Şekil 74: Serum:DMEM (1:1) çözeltisine 5IU heparin ilavesi ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen absorbanlarına ait histogram	126
Şekil 75: Serum:DMEM (1:1) çözeltisine 10IU heparin ilavesi ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen absorbanlarına ait histogram	126
Şekil 76: Serum:DMEM (2:1) çözeltisi ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen absorbanlarına ait histogram	127
Şekil 77: Serum:DMEM (2:1) çözeltisine 5IU heparin ilavesi ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen absorbanlarına ait histogram	127
Şekil 78: Serum:DMEM (2:1) çözeltisine 10IU heparin ilavesi ile inkübasyona bırakılan Calu-3 hücrelerinin MTT yöntemi ile elde edilen absorbanlarına ait histogram	128

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- DCM: Diklormetan
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Media
DMSO: Dimetil sülfoksit
DSC: Diferansiyel tarama kalorimetresi
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
Et-Ac: Etil asetat
FBS: Fetal bovine serum
GLM: General Linear Model
HAC: Havayolu aşırı cevaplılığı
KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalık
LMWH: Düşük molekül ağırlığında heparin
MTT: 3-[4,5-Dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil tetrazolyum bromid
PLA: poli laktik asit
PLGA: poli-DL –laktik-ko-glikolik asit
Raw : Havayolu direnci
SEM: Taramalı elektron mikroskobu
sGaw: Spesifik havayolu direnci
TEER: Transepitel elektrik direnci

ÖZET

Yıldız A. Heparin Mikrokürelerinin Hazırlanması ve Akciğerlere Hedeflenmesi,
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi, İstanbul, 2006.

Negatif yüklü makromolekül olan heparin akciğerlerdeki lökositlerden salınan katyonik protein hasarını nötralize etmektedir. İnhalasyon yolu ile uygulanan heparin antienflamatuvar etkisi ile havayolu aşırı duyarlılığını azaltıcı etki göstermektedir. Bu çalışmada heparinin valide edilmiş hayvan modelinde antijene bağlı akciğer inflamasyonu ve havayolu aşırı duyarlılığı üzerinde etkisi gösterilmektedir. Bu amaçla hazırlanan uzatılmış etkili heparin mikrokürelerinin geliştirilmesi, karakterize edilmesi ve belirtilen hayvan modelinde test edilmesi amaçlanmıştır. Heparinin pulmoner mukozadan absorpsiyonunu sağlamak amacıyla düzgün yüzeyli küçük partikül büyüklüğüne sahip heparin yüklü mikroküreler hazırlanmıştır. Bu amaçla farklı polimer-etkin madde oranında (10:1, 5:1 ve 2:1) mikroküreler, farklı rezomerler (RG[®] 503, RG[®] 502, RG[®] 504) ve çözücüler (diklormetan, etil asetat) ile poli (D,L-laktik-ko-glilolik asit) kullanılarak çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanmıştır. Mikrokürelerin; şekil ve yüzey özellikleri, partikül büyüklükleri, yüzey yükleri, üretim verimleri, tutma kapasiteleri, in vitro salım çalışmaları, kültür edilmiş insan bronşiyal epitelyal hücreleri (Calu-3) üzerine sitotoksik etkileri ve kobaylar üzerinde antijene bağlı akciğer enflamasyonunu ve havayolu aşırı duyarlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Bu çalışma ile pulmoner uygulamaya elverişli olarak hazırlanan heparin yüklü mikroküreler karakterize edilmiş ve kobaylar üzerinde antijene bağlı akciğer enflamasyonunu ve havayolu aşırı duyarlılığını uzatılmış etki sağlayarak azalttıkları kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Heparin, mikroküre, poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit); havayolu aşırı duyarlılığı, pulmoner yol.

Bu çalışma Avrupa Birliği 6. Çerçeve Programı Marie Curie ön aşama eğitimi altında yer alan Galenos Network bursu ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Yıldız A. Preparation and Pulmonary Delivery of Drug-Loaded Microspheres, İstanbul University Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology PhD thesis, İstanbul, 2006.

The negatively charged macromolecule, heparin, can neutralise the effects of damaging cationic proteins released from leucocytes in the lung. Inhaled heparin may serve an anti-inflammatory action modifying airway hyper-reactivity (AHR). Validated in-vivo model was used to show the effectiveness of heparin in modifying antigen-induced lung inflammation and airway hyper-reactivity. In this study, develop, characterise and test a sustained release microparticle formulation of heparin for use in the above model. Heparin-loaded microparticles having smooth surface and small particle size were designed in order to provide the absorption of heparin through pulmonary mucosa. For this purpose, microparticle at different polymer-drug ratios (10:1, 5:1 and 2:1), at different resomers (RG[®] 503, RG[®] 502, RG[®] 504) and solvent (DCM, Eth-Ac) were prepared by spray drier method with poly(D,L-lactic-co-glycolic acid). The microparticles were for evaluated shape and surface properties, particle size, surface charge, production yield, encapsulation efficiency permeability of cultured human bronchial epithelial cells and in vitro drug release.

Heparin-loaded microparticles suitable for pulmonary administration have been characterised and proved to decrease modifying antigen-induced lung inflammation and airway hyper-reactivity with sustained release effect of the heparin in guinea-pig model.

Keywords: Heparin; poly (D,L-lactic-co-glycolic acid); microparticles; pulmonary route; airway hyper-reactivity.

This study was supported by Galenos network funded programme under the The European Union 6th Framework Marie Curie Early Stage Training scheme.

GİRİŞ VE AMAÇ

Heparin, D-glukozamine-2,6-disülfat ve D-glukuronik asit-2-sülfat yapısında polianyonik, glikozaminoglikandır ve klinikte antikoagülan olarak kullanılan bir maddedir (1).

Endojen heparin mast hücrelerindeki granüllerde histamin gibi çeşitli proenflamatuvar araçılara bağlı olarak bulunur (2). Heparin nötrofil kemotaksisi ve lenfosit trafiği üzerine etki ederek çeşitli şekillerde bağışıklık yanıtını etkilemektedir (3).

Bu şekilde heparin histamin salımını inhibe edip ve mast hücre uyarıcılarını degranüle ederek koyunlarda ve insanlarda astımda antijene bağlı bronkokonstriksiyonu azaltmaktadır (4-7). Buna ilave olarak heparin solunum yolu düz kas hücrelerinin tonusunu azaltarak astımda solunum yolunu rahatlatır (8). Heparinin damar düz kası hücrelerinde üreme azaltıcı etkisi olması da bunu kanıtlayan önemli verilerden biridir (9)

Alerjik reaksiyon sırasında eozinofil katyonik protein ve peroksidaz gibi sitotoksik araçların üretildiği eozinofilleri içeren birçok farklı hücre aktive olur (10). Anyonik molekül olan heparin hızlı bir şekilde katyonik yüklü olan bu proteinlere bağlanır (11). Negatif yüklü heparin, akciğerlerdeki lökositlerden salınan katyonik proteinlerin zararını nötralize edebilmektedir (12). Heparin, major bazik protein, eozinofil katyonik protein ve eozinofil peroksidaz gibi sitotoksik etkileri olan spesifik eozinofil granül proteinlere bağlanıp onları inhibe eder (13). Major bazik protein ve eozinofil katyonik protein eozinofil granüllerinde bulunan bronşiyal astımın patojenezine katıldığı kabul edilen katyonik proteinlerdir. Son yıllarda serum veya bronkoalveolar lavaj sıvısında major bazik protein ve eozinofil katyonik protein seviyesinin astımda oluşan bronşiyal hiper yanıt ile orantılı olduğu tespit edilmiştir. Bu her iki sitotoksik proteinin yüksek katyonik yapısı sentetik polikatyonik olan poli-L-arjininden gelmektedir (14). Eozinofil katyonik proteinin izoelektirik noktası 10,8 dir ve bu yüksek katyonik yapı molekül yüzeyindeki arjinin sayısına bağlıdır ve hücre zarlarında negatif yüklü molekülleri bağlama kapasitesi de buna bağlı olarak artar (15).

Havayolu aşırı duyarlılığı astımın patofizyolojisinde önemli bir role sahiptir (16) ve antienflamatuvarlar gibi antialerjik ajanlarda havayolu aşırı duyarlılığını azaltır (17).

Inhalasyon ile uygulanan heparinin antialerjik aktivitesi vardır (18) ve alerjik koyunlarda antijene bağılı havayolu aşırı duyarlılığını önleyici etkisi kanıtlanmıştır (5).

Hastalarda düşük dozda (5000-10 000 IU/gün) heparin kan dizkrezisi dışında kanama riski oluşturmamaktadır (19). İnsanlarda intrapulmoner heparin kullanımı sonrası solunum yolu parametrelerinde değişiklik olmadığı saptanmıştır (19). Yüksek dozda heparin pıhtılaşma parametrelerini ve saniyedeki nefes verme hacim kuvvetinin (FEV1) referans değerini değiştirmemektedir ve bu nedenle antienflamatuvar özelliği gibi yararlı etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır (12).

Solunum yolu hastalıklarında, uzatılmış etkili etkin madde salımının, ilaç kullanımının azalması, tedavi yönetiminin ve hasta uyuncunun iyileştirilmesi ve ilacın yan etkilerinin azaltılması açısından oldukça önemi vardır (20,21), ayrıca uzatılmış etkili tedavide maliyetin azalması da söz konusudur (22).

Bronşiyal büyümede 24 saatlik ritm olması (23) ve alerjenlere karşı en fazla solunum yolu aşırı duyarlılığının gece gözlenmesi nedeniyle gece periyodu astımda en zor geçen süredir (24). Bronkodilatör tedavinin 24 saatin üzerinde olması ve en azından hastalık semptomlarının gece azalması istendiğinden uzatılmış etki sağlayan ilaçlara ihtiyaç vardır. Uzatılmış etkili etkin madde salımı özellikle yatmadan önce uygulanırsa dozsuz geçen gece periyodu ve bu şekilde koruyucu ve gelişmiş bir tedavi sağlar.

Bu çalışmada poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kullanılarak püskürtme ile kurutma aleti ile heparin yüklü mikroküreler hazırlanmıştır. Formülasyon değişkenlerinin mikrokürelerin yüzey özellikleri, partikül büyüklükleri ve heparin yüklenmesi ve etkin madde salımı gibi özelliklere etkisi araştırılmıştır:

i) Son yıllarda yapılan çalışmalarda polimerlerin molekül ağırlıklarının etkin madde salım oranını etkilediği gösterilmiştir bu nedenle bu çalışmada farklı molekül ağırlığında rezomerler kullanılmıştır.

ii) Rezomerler ile mikroküre hazırlanmasında çözücü olarak sıklıkla diklormetan (DCM) kullanılmaktadır. Bu çözücünün toksisitesi nedeniyle miktarının azaltılması veya tamamen farklı bir çözücü ile mikroküre elde edilmesi amacıyla çözücü olarak etil asetat (EtAc) kullanılmıştır.

iii) 3 farklı polimer-etkin madde oranı (10:1, 5:1, 2:1) kullanılarak polimer-etkin madde oranının formülasyon özelliklerine etkisi araştırılmıştır.

iv) Püskürterek kurutma yöntemine ait parametreler (akış hızı, enjektör çapı, giriş sıcaklığı, çıkış sıcaklığı, püskürtme basıncı, havalandırma oranı) geliştirilmiştir.

Hazırlanan mikrokürelerin yüzey özellikleri araştırılmıştır. Polimer-etkin madde oranı, rezomer tipi ve kullanılan çözücülerin mikroküre formülasyonu üzerine etkisi, etkin madde yükleme kapasitesi, partikül büyüklüğü, heparin mikrokürelerinin kültür edilmiş insan bronşiyal epitel hücrelerinden geçişe etkisi ve poli-L-arjinin-heparin çözeltisi ile poli-L-arjinin-heparin yüklü mikroküre karışımlarının zeta potansiyel yükü araştırılmıştır. Formülasyonlar in vitro salım çalışmaları ile karakterize edilmiş, in vitro salım çalışmaları ile etkin madde yükleme kapasiteleri göz önüne alınarak partikül büyüklüğü pulmoner yol ile uygulamaya en uygun formülasyon in vivo çalışmalar için seçilmiştir.

Kobaylarda ovalbumine bağlı solunum yolu aşırı duyarlılığı oluşturulmuş ardından kontrol olarak serum fizyolojik çözeltisi bunun dışında heparin çözeltisi (2 uygulama ve 5 uygulama) ve heparin yüklü mikroküreler (2 uygulama) nebulizatör ile hayvanlara pulmoner yoldan verilerek spesifik havayolu direnci (sGaw) ölçümü yapılmıştır. İn vivo veriler hayvanlardan alınan ve bronkoalveolar lavaj sıvısında yapılan alerjik hücre sayımı ve eozinofil katyonik protein miktarı sonuçları ile desteklenmiştir. Ayrıca in vivo çalışmaların ardından kobaylardan alınan serumların Calu-3 hücrelerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada oldukça küçük partikül büyüklük dağılımı olan, iyi morfolojik özelliklere ve yüksek etkin madde salımına sahip, uzatılmış etkili heparin yüklü mikroküreler üretilmiştir. Heparin yüklü mikrokürelerin pulmoner uygulama için uygunluğu karakterize edilmiş ve kobay modelinde pulmoner yoldan uygulama için seçilen formülasyonun heparin çözeltisi ve serum fizyolojik uygulaması ile mukayesesinde uzatılmış etki sağlayarak antijene bağlı akciğer inflamasyonu ve solunum yolu aşırı duyarlılığında etkili olduğu tespit edilmiştir.

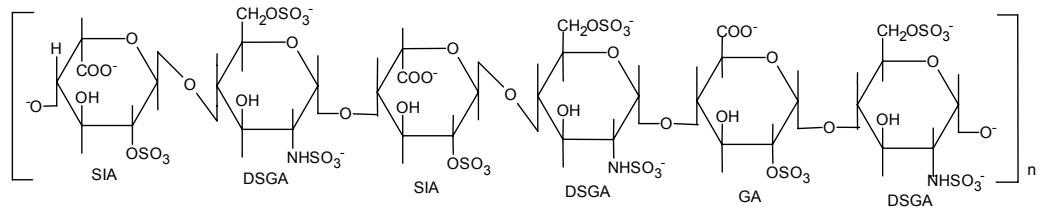
GENEL BİLGİLER

1. HEPARİN HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Heparin sıgır akciğeri ve domuz ince barsak mukozasından ekstraksiyon ve saflaştırma suretiyle elde edilen doğal bir maddedir (25). Heparin, kimyasal olarak glikozaminoglikan yapısında; zincir uzunluğu farklı asidik polisakaritlerden oluşmuş bir mukopolisakarittir (26).

Kapalı formülü: Kimyasal yapısı, β -D-glikozidik bağla bağlanmış ekimoleküler miktarlarda uronik asit ve 2-asetamido-2-deoksi-D-galaktoz (N-asetilkondrozamin) dir (25).

Açık formülü:



SIA: 2- Sülfoiduronik asit, DSGA: 2,6 disülfoglikozamin, β -GA: β - glukuronik asit (27)

Molekül ağırlığı: 6000-30000 Dalton dur.

Heparin antikoagulan etkiye sahip bir maddedir ve bu etkisini antitrombin III ü inhibe ederek gösterir (26). Doğal heparinin büyük bir kısmı mast hücreleri ve bazofil lökositlerde histamin ile birleşmiş şekilde bulunur (25).

Fiziko-kimyasal özellikleri: Beyaz veya renksiz amorf, kokusuz ve orta derecede higroskopik toz bir maddedir (26). Avrupa Farmakopesi ne göre 1 kısım heparin 2.5 kısım suda çözünür ve %1 lik çözeltisinin pH sı 5,0 – 8,0 dir (28). Amerikan Farmakopesi ne göre ise 1 kısım heparin 20 kısım suda çözünür ve %1 lik çözeltisinin pH sı 5,0-7,5 dir (29).

Infrared Spektrumu: Domuz mukozasından izole edilen heparin sodyumun infrared spektrumu 4000-600 cm^{-1} arası kayıt edilmiştir.

1605 cm^{-1} de asimetrik COO^- , 1429 cm^{-1} de simetrik COO^- , 1623 cm^{-1} de Amide I, 1480 cm^{-1} de Amide II, 1245,1222 cm^{-1} de asimetrik S=O, 1660 cm^{-1} simetrik S=O, 980 cm^{-1} de simetrik C-O-S, 820 cm^{-1} de asimetrik C-O-S bantları görülür (30).

Ultraviyole Spektrumu: Heparinin ultraviyole spektrumu Bell ve Krantz tarafından 1950 yılında incelenmiş; 245 nm ve 292 nm de maksimum ve 240 nm ve 260 nm de minimum absorpsiyon gösterdiği saptanmıştır (30).

1.1. Teşhisi

1.1.1. Kağıt Kromatografisi

Heparinin kağıt kromatografisi ile teşhisi, propanol-su (1:1.5) çözücü karışımı ve %0.15 toluidin mavisi reaktifi kullanılarak yapılmıştır. Mavi zeminde pembe renkte lekeler (Rf 0,57) elde edilmiştir (31).

Heparinin kağıt kromatografisi sisteminde, mobil faz olarak amonyum formiyat tamponu-izopropanol (65:35) ve propanol-formik asit-su (30:10:40) çözücü sistemi kullanıldığı kayıtlıdır (30). Lekelerin tespiti Azur A ve toluidin mavisi reaktifleri ile yapılmıştır .

1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Heparinin İTK ile teşhisi için mobil faz olarak; metanol-piridin-su (30:20:20); amonyak (%25)-piridin-su (60:35:5); n-butanol-glasiyal asetik asit-su (3:1:1), adsorban olarak ise, magnezyum oksitle işlenmiş selüloz ve selüloz MN 300 kullanılmıştır (31,32). Reaktif olarak ise, %2 sodyum nitrat, diozalandırılmış p-nitroanilin reaktifi, ninhidrinin asetondaki %1 lik çözeltisi, Azur A reaktifi, p-dimetilamino benzaldehit reaktifi, bakır sülfatın sudaki %10 luk çözeltisi ile %2 lik amonyak çözeltisi, Eriochrom black T nin sudaki %0.125 lik çözeltisi, Water blue nun sudaki %0.065 lik çözeltisi, Akridin oranj (1mg/1ml), Bromkrezol yeşili (1 mg/ml) ve Azokarmin G (5 mg/ml) boyaalarının çözeltileri kullanılmıştır (30, 33).

1.1. Miktar Tayini

1.2.1. Metakromaziye Dayanan Yöntem

Metakromazi, absorpsiyon maksimumunun daha aşağıdaki dalga boylarına kayması, absorpsiyonun alçalması şeklinde tanımlanmıştır (33). Metakromazi gösteren maddelere kromotrop maddeler denir. Bunlar genellikle biyolojik kaynaklı, yüksek moleküllü polianiyonlardır (34). Mukopolisakkaritlerin, serbest amino grubu taşıyan bazı boya çözeltilerinin absorpsiyon spektrumunu daha aşağı dalga boyuna değiştirdikleri yani metakromazi gösterdikleri literatürde kayıtlıdır (33).

Metakromazi gösteren maddeler arasında kondroitin sülfat, hiyaluronat, nükleik asit, alg polisakaritleri (agar, karrageenan ve aljinat), kitin sülfat, karboksimetil selüloz yer almaktadır. Ayrıca sabunlar, anyonik deterjanlar, miristat, yüzey aktif ajanlar ve fosfolipitler gibi küçük molekül ağırlığına sahip maddelerin de kromotropik özellik gösterdikleri literatürde bildirilmiştir (34).

Heparin çözeltilerinde azo, tiazin, oksazin, azin, trifenilmetan ve akridin grubu boyalar ile metakromazi gösterdiği bildirilmiştir (33).

Heparinin çeşitli metakromatik boylarla spektrofotometrik miktar tayinleri yapılmıştır. Kullanılan boyalar arasında; metilen mavisi (30), Alcian blue, gece mavisi (35), Azur A (36) , Azur I ve Azur II (33) kullanılmıştır.

Metakromaziye ait miktar tayini yöntemleri iki esasa dayanır. Birincisi boyanın maksimum absorbansına, ikincisi ise metakromazik kompleksin maksimum absorbansına dayanan tayin yöntemlerdir (34). Bunlardan başka metakromaziye dayanan titrimetrik ve spektrofotometrik miktar tayinine ait değişik yöntemler de kaydedilmiştir (27).

Heparinin, Azur A ile metakromazisi spektrofotometrede incelendiğinde, maksimum dalga boyunun 610 nm den 510 nm ye değiştiği görülmektedir. Reaksiyonun yürüyüşü bazik boya ile heparinin asit grupları arasında olmakta ve bu reaksiyonda boya konsantrasyonun önemli olduğu bildirilmektedir (35). Ayrıca kullanılacak heparin konsantrasyonu da önemli olup, fazla kullanılması metakromaziye engellemektedir (30). Ayrıca, metakromaziye ortamın pH sınırı da etkili olduğu, pH'nın artmasıyla metakromatik indeksin arttığı bildirilmiştir (34).

1.2.2.Diğer Yöntemler

Heparinin miktar tayininde kullanılan diğer yöntemler arasında; potansiyometrik, kondüktometrik, kolorimetrik türbidimetrik ve polarografik (30), nefolometrik (37) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (38) yöntemlerinin bulunduğu bildirilmiştir.

Ayrıca biyolojik tayin yöntemlerinden Aktive Edilmiş Kısmi Tromboplastin Zamanı (aPTT) (39), Tam Kan ve Trombin Yöntemleri (40), Rekalsifikasyon Zamanı Tayini ve Plazma Yöntemleri (37), Heptest ve HepacLOT Yöntemleri (41) de heparin miktar tayininde kullanılmaktadır.

1.3. Stabilitesi

Liyofilize haldeki kuru heparin sodyumun, bir kaç yıl oda ısısında ve 40°C nin altında saklanabileceği bildirilmiştir (26). Heparinin oda ısısında (15-25°C) ve 30°C de stabil olduğu ve sulu çözeltilerinde 36 ay süresince aktivitesinde bir değişiklik olmadığı kaydedilmiştir. Ayrıca pH 4,0-9,0 aralığında sulu çözeltilerinde aktivitesinde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (30). Heparin sodyum enjeksiyonluk formülasyonunun oda temperaturünde 7 yıldan fazla, 37°C de ise 6-8 yıl stabil olduğu da literatürde kayıtlıdır (33).

1.4. Farmakolojik Özellikleri

Heparin, antikoagülan özelliğe sahip bir maddedir. Antikoagülan özelliğini hem in vivo ve hem de in vitro şartlarda gösterir. Heparin bir antikoagülan olarak yaklaşık 45 yıldan beri özellikle ven trombozunun standart tedavisinde paranteral olarak kullanılmaktadır (42). Heparin kan nakli veya kan örneklerinin pıhtılaşmasını önlemek için in vitro olarak da kullanılır (26). Heparin antikoagülan etkisini, molekül ağırlığı yaklaşık olarak 65 000 dalton olan ve plazmada ortalama 150 µg/µl konsantrasyonda bulunan AT-III proteinini aktif hale geçirerek gösterir. AT-III heparin ile aktifleştğinde birer proteolitik enzim olan trombin, faktör Xa, faktör XII, faktör XI, faktör VII ve kallikrein üzerinden inhibe ederek pıhtılaşmayı engeller (40).

Heparin, AT-III ü aktifleştirmek suretiyle direkt trombin üzerine etki ederek fibrinojenden fibrin oluşumunu engellemekte, diğer yandan pıhtılaşma faktörlerine de etki ederek trombin miktarını azaltmaktadır (43).

1.5. Farmakokinetik Özellikleri

Heparin sadece parenteral yoldan kullanılmaktadır (43). Heparin, dolaşım sisteminde hızla damar endotel hücrelerine ve retiküloendotelial sistem hücrelerine geçmektedir (25).

Heparin aktivitesi, normal kişilerde doğal heparin-protein karışımının hidrolitik parçalanmasından sonra plazmada 10-24 IU/ml civarında bulunur (30). Heparin tedavisi, uzun süre kanda dolaşan ve sağlam antitrombozis proflaksisine neden olan inhibitör kompleks antitrombin III'ün aktivasyonuna inhibe edici etkisiyle gerçekleşir (40).

İntravenöz enjeksiyondan sonra yaklaşık olarak 40 dakika içinde %80-90 oranında enjektörde olan heparin sistemik dolaşıma dağılır, dalak ve karaciğerdeki

retiküloendotelyel dokuda metabolize olur. Yarılanma ömrü yaklaşık olarak 1.5 saattir. Dağılım hacmi ise yaklaşık olarak vücut ağırlığının %5,5 dir (30).

1.6. Heparinin Alternatif Kullanım Yolları

Heparinin en iyi bilinen özelliği olan antikoagülan özelliği dışında antilipemik (44), tümör gelişimini engelleyici ve anjiyogenezi düzenleyici (45), antibakteriyal ve antiviral gibi diğer farmakolojik özellikleri çalışılmıştır (44).

Bu farmakolojik özellikleri aşağıdaki etkilere bağlıdır (44):

- Antienflamatuvar etkisi (oluşturucu nedenin düzenlenmesini sağlar)
- Zararlı ve enfeksiyon maddelerini inhibe edici etkisi (hiyaluronidaz inhibisyonu ile)
- Steroit hormonlar histamin salımı yapan kısımlar ve zararlı aminler ile etkileşime uğrar.

Johansson (46) heparinin antialerjik etkisi olduğunu vurgulamıştır. Dahl (47) bu düşünceyi deneysel olarak ispatlamaya çalışmıştır ve özel antijeni hastalara vermeden önce heparin enjekte edilen hastalarda alerjik astımı engellemeyi başarmıştır. Ayrıca heparinin otoimmün hemolitik anemide bir kısım hastada etkili olduğunu göstermiştir.

Donzelot ve Kaufmann (48) heparinin kötü romatizma vakalarında farklı bir yoldan etki ederek tedavi ettiğini ve aktivitesinin hiyaluronidazı inhibe ederek oluştuğunu düşünmektedir. Heparinin bağlı dokularda romatizma üzerindeki etkisi antienflamatuvar özelliği ile ilişkilidir. Diğer tedavi edici etkisi ise tromboflebit ve interstitial sistit üzerinedir.

Heparin; çoklu sklerozisler üzerinde etkilidir ve araştırmacılar bunun lipit metabolizması üzerinde etkisi ile ilgili olduğunu düşünmektedirler (49, 50).

Heparinin ayrıca tinnitus, ani sağırılık, Meniere's hastalığı ve Bell's felcinde de etkili olduğu bildirilmiştir (51). Bu tedavilerde nikotinic asit prokain ile kombine halde kullanılmıştır. Viral enfeksiyon vakalarında heparinin etkisinin antienflamatuvar veya antihyaluronidaz etkisi ile olabileceği vurgulanmıştır .

Hyaluronidazlı heparinoid kombinasyonu ile hazırlanan merhemlerin etkisi Sikorski tarafından tekrar gözden geçirilmiştir (52). Bu merhemler yüzeysel flebit, hematoma, varisli damar, inflame hemaroid, don incinmesi, diabetik nekrozun ön safhası, tortikollis ve ter bezleri absesinde iyi sonuçlar alınmıştır.

1.6.1. Parenteral Yoldan Uygulanması

Heparinin parenteral uygulamasında yeni stratejilere damar içine yerleştirilen stentler ve antikor hedefli yaklaşımlar eklenmiştir (53-56). Heparin yüklü zein mikroküreleri kardiyovasküler uygulandığında ilaç yüklü stentlerin kan uyuşmazlığını düzeltmiştir. Hiç bir yüklü stent, stent implantasyonunu takiben trombotik komplikasyonları azaltamamaktadır. Stentlerin performansında dizayn ve konfigürasyon önemli rol oynar. Çapraz bağlı fibrinlere hedeflenmiş antikor bazlı anti-restenoikler için dizayn edilen lokal salım yapan stentler fraksiyonlanmamış heparin (UHF) ve düşük molekül ağırlıklı heparin (LMWH) hedeflemesi ile hasarlı arter duvarlarında sistemik komplikasyon olmaksızın lokal etki sağlamaktadır (57).

Heparin antikoagülan özelliği dışında paranteral olarak aşağıdaki hastalıklarda da kullanılmaktadır.

Ekzama: Heparinin antikoagülan kullanımını dışında ilk seçilen kullanım alanı; tümünde histamin salımı olan enflamasyon, alerji ve enfeksiyonun bir arada bulunduğu görünür lezyonlarla teşhis edilen klinik problem olan ekzamadır. Bu hastalıkta heparin ile birlikte antibiyotik neomisin, streptomisin, polimiksin, viomisin heparin ile kombine halde kullanılır. Heparin bu kombinasyonda endojen olarak salınan histamini bağlayarak antienflamatuvar etkisi ile ikincil bir etki sağlar.

Klinikte iki tip ekzama vardır; birincisi bir çok tedavi türüne yanıt verir; ikinci tip tüm tedavilere dirençlidir. İkinci tipteki hasta grubu arasından iki yıllık tedaviye yanıt vermeyen grup Doughtry ve ark. yaptığı çalışma için seçilmiştir. Antibiyotik-steroid karışımına yanıt vermeyen hastalarda %3 antibiyotik, %2,5 kortizon ve %1 oranında heparin karışımı lokal olarak uygulanmıştır. 3 kişi haricinde 63 hasta bu tedaviye olumlu yanıt vermiştir (44).

Saman Ateşi: Heparinin ekzamada kullanımı ile klinikte histamini bağladığı gözlenmiş ve saman ateşi tedavisi için çalışmalar başlatılmıştır. Heparin 100-200 mg aralığında i.v olarak akut polinosiz atağı geçiren 27 hastaya enjekte edilmiş ve alerjik belirtilerden olan burun tıkanıklığı, akıntısı, konjunktivit, kızarıklık ve deri kaşınması gibi pek çok vakada yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Nazal polipli kronik vakalarda benzer tedaviye bir kaç gün devam edilmiştir. Poliplerin çoğunda etkili olmamış ancak polinosiz belirtileri yok olmuştur (44).

Laryngotrekeal Bronşit: Bu vakalarda 100-200 mg heparin i.v olarak uygulanarak 10 çocuk tedavi edilmiştir. Hepsi heparine erken yanıt vermiştir ve 9 vaka trakeotomi den kurtulmuştur (44).

1.6.2. Oral Yoldan Uygulanması

Heparinin oral kullanımı ile ilgili çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmıştır. İn vivo çalışmalarda fare (45,58), sıçan (59-62), tavşan (63,64), köpek (65), domuz (61), primat (66) ve insanlar (67-69) kullanılmıştır. Heparinin hidrofobik organik bazlı kompleksleri (70, 71) veya spermin ve lizin tuzları (72) sıçan ve köpeklere intraduodenal uygulaması ile limitli oral biyoyarlanım gözlenmiştir. Başka bir çalışmada heparin ile birlikte verilen organik asitlerin farelerde ince barsaklardan absorpsiyonu arttırdığını göstermiştir (73). Heparinin yağ/su emülsiyonlarının (74), lipozomların (65) ve kalsiyuma bağlı moleküllerin (75) oral heparinin absorpsiyonunu arttırdığı kanıtlanmıştır (66). Heparin: SNAC (sodium N-(8[2-hidroksibenzoil] amino) kaprilat karışımının ven trombozu oluşturulmuş model sıçanlara oral uygulanması sonucu aPTT seviyesini yükselttiği ve derin ven trombozunda başarılı bir sonuç verdiği görülmüştür (76).

1.6.3. Nazal Yoldan Uygulanması

Nazal yol son yıllarda ilaçların sistemik uygulaması açısından oldukça önem taşımaktadır. Heparinin intranazal uygulaması ile ilgili çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Araştırmalar sıçanda (77,78) ve insanda (79,80) gerçekleştirilmiştir. Nazal heparin salım sistemleri tek dozda hızlı etki elde edilmesi ve karaciğer ilk geçiş etkisinin olmaması açısından tercih edilmektedir. Heparinin bu yoldan başarılı ve güvenli uygulaması sistemik tromboz tedavisi dışında diğer hastalıklar için de (alerji vb.) (79, 80) geçerlidir. Vancheri ve ark. yaptıkları bir çalışmada alerjik rinitte heparinin eozinofil miktarını azaltarak etkili olduğu tespit edilmiştir (80). Bir başka çalışmada mast hücresi aktivasyonunu inhibe ederek adenozin mono fosfata karşı koruyucu etki sağladığı bunun sonucunda başarılı bir oranda histamin ve triptaz azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (79). Yıldız ve ark. yaptıkları bir diğer çalışmada heparin yüklü poli (D,L-laktit) (PLA) mikroküreleri intranazal olarak sıçanlara uygulandığında 48 saat boyunca antikoagülan etkinliğin sürdürdüğü ve heparin çözeltisine göre oldukça yüksek biyoyarlanım sağlandığı tespit edilmiştir (81). Heparinin antikoagülan özelliği ve

vagal aktivasyonu ile ilgili bir çalışmada kan pıhtılaşmasında önleyici olduğu ve kalp atımında düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (59).

1.6.4. Transdermal Yoldan Uygulanması

Heparinin in vitro ve in vivo perkütan absorpsiyonuna ait çeşitli çalışmalar vardır (82,83). Bu yol geleneksel ilaç salım sistemlerine göre avantajlara sahiptir. Ağrıyı minimuma indirir ve uzatılmış etki sağlar. Heparinin transdermal salımının en büyük dezavantajı bu biyoaktif makromolekülün deri üzerindeki *stratum corneum* dan geçişinin zor olması nedeniyle düşük biyoyararlanımıdır. Çalışmalarda bu bariyerden geçişin kolaylaştırılması ve geçirgenliğin artırılması için penetrasyon arttırıcılar (83, 84) ve lipozomlar (85,86) kullanılmış ve fonoforez (87,88), elektroporasyon (89,90), iyontoforez (88,89), iğnesiz enjeksiyon (91), mikroiğneler (92) gibi tekniklerden yararlanılmıştır.

1.6.5. Rektal Yoldan Uygulanması

Heparinin rektal uygulaması ile ilgili bazı stratejiler geliştirilmiştir. Ana formülasyon stratejisi sodyum kolat (93), safra tuzu (94), ve sodyum lauril sarkosinat kullanılarak hücre zarı geçirgenliğinin artırılması üzerinedir. Yağ emülsiyonları heparinin biyoyararlanımını 20 kat arttırmaktadır (95). Yüzey aktif olmayan adjuvanlar ile heparinin tavşanlarda rektal absorpsiyonu araştırılmış (96) ve rektal mukozadan geçtiği saptanmıştır.

1.6.6. Pulmoner Yoldan Uygulanması

Heparinin pulmoner uygulanması ile ilgili farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bu yol ile heparin uygulamasının özellikle pulmoner embolizmde yararları vardır. Pulmoner yol ile heparin uygulaması çalışmalarında fare (97), sıçan (98,99), kobay (100), tavşan (101,102), koyun (4), köpek (97) insanlar (103) kullanılmıştır. Heparinin pulmoner yoldan tromboembolizme karşı sistemik etkisi nedeniyle kullanımı dışında lokal olarak alerji ve astım tedavisinde kullanımına ait çalışmalar mevcuttur.

Astım: Son yıllarda akut astım krizlerinde heparin kullanımı konusunda çalışmalar yapılmıştır. 10 erkek, 14 kadın hastaya i.v yol ile uygulanan 100-200 mg krizin ilk 24 saatinde heparinin tedavi edici etkisi tespit edilmiştir. Astımda oluşan hırıltının 17 vakada ortadan kalktığı, 6 vakada etkisinin azaldığı ve 1 vakada ise başarısızlık ile sonuçlandığı görülmüştür. Heparin, oluşan öksürüğün giderilmesinde

aynı şekilde tedavi edici etki göstermiştir. 15 vakada öksürük kesilmiş, 8 vakada öksürük etkisi azalmış ve 1 vakada etki görülmemiştir. 24 vakanın 23 ünde solunum kolaylaşmış ve tüm hastalar tedavi süresince kendilerini sıcak ve rahat hissettiklerini belirtmişlerdir (44).

Heparin aşırı derecede esnek yapısı ve yüksek anyonik yükü ile vücutta enzimler ve reseptörler gibi çeşitli moleküller ile etkileşime girer (12).

Heparin mast hücrelerinin stoplazmasında bulunur, antienflamatuvar etkisinin bu şekilde sağlandığı tahmin edilmektedir. İnsan akciğeri özellikle astım gibi patofizyolojik durumlarda heparin üreten ve salınımı gerçekleştiren birçok mast hücresine sahiptir. Astım, allerjenin vücuda alımıyla oluşan inflamatuvar bir hastalıktır. Yeni sentezlenen veya ön formunda olabilen medyatörün bronşiyal tonda, damar geçirgenliğinde ve sıvı ve mukus üretiminde etkisi olur. Pro-astmojenik olarak düşünülen birçok medyatör örneğin histamin, bradikinin, trombosit aktive edici faktör (PAF) ve lökosit faktörler, prostaglandin E₂ (PGE₂) ve heparin gibi koruyucu faktörler bronkokonstriktör yanıtta ilerlemeyi dengelemek için salınırlar (5).

Heparin derivelerinin gözlemlenen bir fizyolojik rolü alerjik reaksiyon sırasında proenflamatuvar araçlara bağlanmasıdır. Bu yeni yaklaşım, heparinin astımda mast hücresi degranülasyonunu azaltarak β_2 agonistlerinin uzatılmış etkisini inhibe edici olabileceğini ve bu şekilde solunum sisteminde önemli koruyucu etki gösterebileceğini savunmaktadır (2).

Heparinin antienflamatuvar özelliklerine dair pek çok kanıt vardır. Alerjik reaksiyon sırasında eozinofil katyonik protein ve peroksidaz gibi sitotoksik maddeleri üreten eozinofilleride içeren birçok farklı hücre aktive olur (10). Heparin gibi anyonik molekül hızla katyonik yüklü proteinlere bağlanır (11). Trombositlerden salınan katyonik protein olan trombosit faktör 4 (PF₄) eozinofiller için kemiotaktik özelliktedir ve heparin tarafından inhibe edilir. Heparinin tamamlayıcı sistemin aktivasyonunu inhibe edici olduğu belirtilmektedir, geniş çaplı immunoallerjik büyük ölçüde nötrofil aktivasyonu ve degranülasyonunu uyarır bunu takiben salınan lizozomal enzimler reaktif oksijen nedeniyle oluşan doku hasarına yanıt verebilmektedir. Heparinin kronik obstrüktif akciğer hastalık (KOAH) lı hastalarda görülen venöztromboembolizme karşı kullanımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur (104)

1.7. Yan Etkileri

Heparinin en önemli yan etkisi aşırı dozda verildiğinde vücudun çeşitli yerlerinde kanama meydana getirmesi potansiyelidir (30). Ayrıca, mutad dozlarda kullanıldığında purpura, ekimoz, melena, hematüri ve diğer şekillerde kanama oluşturduğuna ait kayıtlar mevcuttur (30).

Özellikle yaşlılar daha yüksek kanama riskine sahip gibi görünmektedirler (105). Ayrıca uzun süre kullanıldığında, seyrek de olsa, trombositopeniye ve trombosit agregasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (26). Heparinin bu risklerinden kaçınmak ve bazı hastalıkların tedavisi için normal heparin yerine düşük molekül ağırlığına sahip heparinler piyasaya (LMWH) sunulmuştur. LMWH molekülünün kimyasal veya enzimatik depolimerizasyonu ile elde edilir ve ameliyat süresince özel venöz tromboembolizmin önlenmesi ve tedavisinde kullanılır (106).

Düşük dozlarda (5000-10 000 IU/gün) heparin kullanımı kan diskrezisi dışında kanamaya neden olmaz (19) ve insanlara intrapulmoner uygulandığında solunum parametrelerinde değişiklik yapmadığı belirtilmiştir (19)

Diğer yan etkileri ise trombositopeni, hipersensitasyon reaksiyonları, lokal iritasyon etkileri, deri nekrozları (26) ve uzun süreli kullanımdan sonra osteoporozisdir (43).

1.8. Farmasötik Preparat Şekilleri

Heparinin piyasada kalsiyum ve sodyum tuzunun enjeksiyonluk preparatları mevcuttur (107).

2. MİKROKÜRELER

2.1. Tanımı

Etkin maddeyi moleküler düzeyde partiküller halinde taşıyan, 0,02-300 µm arasında değişen çap dağılımına sahip gözenekli veya gözeneksiz, vücutta parçalanabilen veya parçalanamayan, farklı yüzey ve yığın yapılarında hazırlanabilen, katı, küresel, mikro taşıyıcılardır (108,109).

Mikrokürelerin hazırlanması ve hedeflendirilmesi amaçları arasında, organizmada etkin madde salımının kontrolü, etkin madde uygulama sıklığının azaltılması, sistemik dolaşımında veya belirli hedef bölgede kalıcı ve sürekli terapötik

etkin madde düzeyinin sağlanması ve etkin maddenin istenmeyen yan etkilerinin azaltılması yer almaktadır (110-112).

2.2. Özellikleri

Mikrokürelerde aşağıda belirtilen özellikler bulunmalıdır (108,109).

- Etkin maddeyi kontrollü bir şekilde salmalı,
- Etkin maddenin yapı ve aktivitesini değiştirmemeli,
- Yeterli etkin madde yükleme kapasitesine sahip olmalı,
- Etkin maddenin salım hızını kontrol edebilmeli,
- Düşük dozda etkin madde kullanımına olanak sağlamalı,
- Biyolojik sistemle uyumlu olmalı, biyolojik olarak parçalanabilmeli ve parçalanma ürünleri de toksik olmamalı,
- Biyolojik yarı ömrü, etkin maddeyi hedef bölgeye ulaştırabilmek için uygun olmalı,
- İn vitro ve in vivo koşullarda dayanıklı olmalı,
- Etkin maddeyi hedef organ doku ve hücreye taşımalı,
- Hedeflenen alana ulaşana kadar etkin madde sızıntısı olmamalı ve etkin madde hedeflenen alanda uzun süre aktivitesini kaybetmeden kalabilmeli,
- Etkin maddeyi plazma enzimlerinin inaktivasyon etkisine karşı korumalı,
- Moleküler ağırlığı glomerüler filtrasyona uğramayacak kadar büyük ancak bütün hücre tiplerine ulaşabilecek kadar küçük olmalıdır.

2.3. Hazırlama Yöntemleri

Mikroküre hazırlama yöntemlerinden en sık kullanılanları aşağıda özetlenmiştir.

2.3.1. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma yönteminde, ilaç polimer çözeltisi içinde çözündürülür veya dispersiyonu hazırlanır ve özel bir alet kullanılarak püskürterek kurutulur. Bu yöntemle hazırlanan mikroküre ve nanopartiküllerin fiziksel özellikleri bazı plastifiyan maddelerin formülasyona ilavesi ile düzeltilebilir. Böylece küresel ve düz yüzeyli partiküller hazırlanabilir. Partiküllerin boyutu; püskürtme hızı, püskürtücü iğne boyutu ve kurutma hızı ile kontrol edilebilir. Bu yöntem; oldukça basit, tekrarlanabilir, verimin fazla ve üretimin kolay olması gibi avantajlara sahiptir (113). Son yıllarda özellikle

mikrokürelerin elde edilmesinde emülsifikasyon yöntemine bir alternatif olarak kullanılmaktadır (114). Emülsiyonun püskürtme ile kurutulması sonucu kuru toz halinde mikroküreler elde edilir (115). Bu yöntem şekil, büyüklük, etkin madde içeriği ve üretim verimi açısından olumlu sonuçlar vermektedir. Bundan başka aşağıdaki üstünlükleri de sağlamaktadır (116,117):

- Hızlı bir yöntemdir,
- Yağ fazı ve ek çözücüler kullanılmasına gerek yoktur,
- Lipofilik etkin maddeler için de uygun bir yöntemdir,
- Büyük miktarlarda üretime olanak sağlamaktadır.

Püskürterek kurutma işleminde peristaltik pompa yardımı ile standart püskürtme iğnesine gelen polimer ve etkin madde içeren çözelti veya süspansiyon, sıkıştırılmış hava basıncı ile ana bölümün içine doğru püskürtülür. Püskürterek kurutma aletinin sağladığı ısı enerjisine bağlı olarak, damlacıklardaki çözücü hızla uzaklaşır. Püskürterek kurutmanın etkinliği; alete verilen ısı enerjisine ve uçurma işleminde kullanılan sıcaklığa bağlıdır. En uygun püskürterek kurutma etkinliği gerekli olan enerji miktarı ile alete verilen enerji miktarının dengelenmesi ile sağlanır. Normal şartlar altında suyun kaynama noktası 100°C dir ve çözücüsü su olan bir çözeltide püskürterek kurutma yöntemi için kullanılması gereken iç ısı miktarı bundan yüksek olmalıdır. Püskürterek kurutma yönteminde püskürtülerek kurutulan mikroküreler aletin toplama kabında toplanır (118-120).

Pavanetto ve ark. (121), püskürterek kurutma yöntemi ile model ilaç olarak deksametazon içeren sığır serum albumini mikrokürelerini hazırlamışlar ve mikropartikülerin partikül büyüklüğünün 10 µm den küçük olduğunu bildirmişlerdir. Formülasyonda kullanılan polimer-ilâç oranı ve farklı sıcaklık-stabilizasyon koşullarının, mikrokürelerin morfolojisi, büyüklüğü, ilâç tutma kapasitesi ve mikrokürelerden in vitro ilâç salımı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; püskürterek kurutma yönteminin hızlı bir yöntem olduğu, ilave bir çözücü veya yağ fazı gerektirmediği ve lipofilik karakterdeki ilâçların albumin mikroküreleri ile hazırlanabildiği ve bu yöntem ile büyük miktarda üretimin yapılabileceği bildirilmiştir.

Santoyo ve ark. (122) yaptıkları çalışmada, antiviral bir ilâç olan sidofovir içeren poli (laktit-ko-glikolit) mikropartiküllerini püskürterek kurutma yöntemi ve çözücü uçurma yöntemleriyle hazırlamışlardır. Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikropartiküllerin ilâç tutma kapasitesinin çok yüksek olduğunu (%80) saptamışlardır.

Hazırlanan bu mikropartiküllerden ilacın salımını in vitro deriden geçiş deneyleri ile incelediklerinde sidofovir içeren mikropartiküller ile ilacın epidermada kalış süresinin arttığını ve deriden geçişinin azaldığını gözlemişlerdir. Hazırlanan mikropartiküllerin deri ile ilacın uzun süre temasını sağlayan ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilceği önerilmiştir.

Başka bir çalışmada, polilaktit-ko-glikolit polimeri ile püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak bupivakainin mikroküreleri hazırlanmıştır. Koyunlarda yapılan in vivo çalışma ile mikrokürelerden ilaç salım zamanının uzadığı kanıtlanmıştır (123).

Püskürterek kurutma yöntemi ile Vitamin C içeren Eudragit® mikrokürelerinin hazırlandığı bir çalışmada, in vitro salım deney bulgularına dayanarak vitamin C içeren mikrokürelerin sürekli salım yaptığı kanıtlanmıştır (124).

Huang ve ark. (125) püskürterek kurutma yöntemi ile model ilaç olarak seçilen betametazonun mikrokürelerini hazırlamışlar ve bu mikropartiküllerin küresel, düzgün yüzeyli ve homojen partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğunu saptamışlardır.

Ganza-Gonzales ve ark. (126) yaptıkları bir çalışmada, metoklopramit içeren kitozan mikrokürelerini püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlamışlardır. Mikrokürelerin hazırlanmasında çapraz bağlama ajanı olarak, %15 den fazla formaldehit içeren kitozan mikroküreleri ile kontrollü salım profili elde edilmiştir. Ancak bu formülasyonda salım hızının ortamın pH sından etkilendiği gözlenmiştir. %20 den fazla formaldehit içeren kitozan mikrokürelerinden ise ilacın salımının pH dan etkilenmediği ve en iyi formülasyon olarak önerilebileceği bildirilmiştir.

Grattard ve ark. (127) püskürterek kurutma yöntemi ile polimer olarak etilselüloz kullanarak hazırladıkları mikrokürelerden küçük ve büyük molekül ağırlıklı maddelerin salım kinetiklerini incelemişlerdir. Etkin maddelerin salım mekanizmasının difüzyon kontrollü olmadığı ve salım hızının matriksin gözenekleri ve maddelerin matriks ile sudaki çözünürlüklerinden etkileyebileceğini bildirilmiştir.

Hasççek ve ark. (115) gentamisin sülfat içeren mukoadezif mikroküre formülasyonlarını püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlamışlar ve mikrokürelerin mukoza üzerinde kalış süresini uzatmak için formülasyonlarda mukoadezif polimer olarak farklı konsantrasyonlarda hidroksipropil metilselüloz kullanmışlardır. İn vitro bulgulara dayanarak, polimer konsantrasyonu arttıkça mikrokürelerden etkin maddenin salım hızının azaldığını göstermişlerdir.

Diğer bir çalışmada gentamisin sülfat içeren poli(laktik asit) ve poli(laktit-koglikolit) mikroküreleri püskürterek kurutma yöntemi ile yaklaşık 3 µm boyutunda ve % 45 tutma kapasitesinde mikroküreler elde edilmiştir (128).

Martinac ve ark. (129) püskürterek kurutma yöntemi ile lipit düzenleyici bir ilaç olan gemfibrozil içeren kitozan mikrokürelerini hazırlamışlar ve in vitro salım çalışmaları ile hazırladıkları mikrokürelerden ilacın sürekli salım yaptığını tespit etmişlerdir.

Pohlmann ve ark. (130) püskürterek kurutma yöntemi ile polimer olarak poli (ε-kaprolakton) kullanarak indometazin içeren nanokapsül ve nanopartiküller hazırlamışlardır. Nanopartiküllerde ilacın 5 ay oda sıcaklığında dayanıklı kaldığı ve partiküllerin morfolojik özelliklerini koruduğunu saptamışlardır.

He ve ark. (119) yaptıkları bir çalışmada, model ilaç olarak suda çözünen simetidin ve famotidinin S/Y/S tipi emülsiyonlarını hazırlamışlar ve püskürterek kurutma yöntemi ile kitozan mikrokürelerini elde etmişlerdir. Çözelti veya dispersiyon şeklinde uygulama ile karşılaştırılan S/Y/S tipi emülsiyon yöntemi ile bu model ilaçların salım sürelerinin uzadığı görülmüştür. Aynı araştırmacıların yaptığı (118) ve püskürterek kurutma yöntemi ile kitozan kullanılarak hazırladıkları çapraz bağlı ve çapraz bağlı olmayan mikrokürelerin küresel ve düzgün yüzeyle olduklarını saptamışlardır. Pozitif yüklü mikrokürelerin partikül büyüklüklerinin 2-10 µm olduğu, partiküllerin büyüklükleri ve zeta potansiyellerinin çapraz bağlama düzeyinden etkilendiği, çapraz bağlama ajanı miktarının azalması ile hem partikül boyutunun hem de zeta potansiyelin arttığını saptamışlardır.

Parodi ve ark. (131) püskürterek kurutma yöntemini kullanarak piroksikamın kitozan mikrokürelerini hazırlamışlar ve tutma kapasitesinin %44-82 arasında, mikrokürelerin %90 nının 3 mikron çapında olduğunu saptamışlardır. Polimer içine ilave edilen poloksamerin ilaç salım hızını kontrol etmek için kullanılabileceğini de bildirmişlerdir.

Püskürterek kurutma yöntemi ile sığır serum albumin yüklü kitozan mikroküreleri nazal olarak uygulanmak üzere hazırlanmış ve yaklaşık 5 µm büyüklüğünde mikroküreler elde edilmiştir (120).

Baras ve ark. (132), püskürterek kurutma yöntemi ile sığır serum albumini yüklü poli (DL-laktit) mikropartikülleri hazırlamışlar, hazırlama parametrelerinin mikropartiküllerin karakterleri ve antijen salımı üzerine etkilerini incelemişlerdir.

Püskürterek kurutma yönteminin aşı taşıyan mikropartiküllerin eldesi için uygun bir yöntem olduğunu saptamışlardır.

Egan ve Ramtoola (133) nin yaptığı bir çalışmada, PLA ve PLGA polimerleri kullanarak püskürterek kurutma ve emülsifikasyon yöntemleri ile vücutta parçalanır mikropartiküller elde edilmiştir. Yapılan in vitro salım çalışmalarında, püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen mikropartiküllerden ilaç salımının emülsifikasyon yöntemine göre daha yavaş olduğu saptanmıştır (134).

2.3.2. Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Laktit kopolimerleri ile glikolit ve ilgili hidroksi asitleri gibi biyolojik olarak parçalanabilen, poliester esaslı mikroküre formülasyonlarının hazırlanmasında en sık kullanılan yöntemdir (135,136). Bu yöntem ile yağ/su (Y/S), yağ/yağ (Y/Y) veya su/yağ/su (S/Y/S) emülsiyonlarından hareket ile mikroküreler hazırlanır (108).

Çözücü buharlaştırma yönteminde polimer organik çözücüde çözündürülür. Etkin madde eklenerek çözelti veya süspansiyon hazırlanır. Etkin madde ve polimer içeren çözeltiyle karışmayan, ikinci bir çözücüde emülgatör çözündürülür. Polimer-etkin madde çözeltisi emülgatör çözeltisi içinde karıştırıldığında damlacıklar oluşur. Daha sonra organik çözücü dağılan damlalardan sıcaklık (108), vakum (137) kullanılarak veya oda sıcaklığında buharlaştırılarak (138) uzaklaştırılır. Oldukça yaygın kullanılan bu yöntem suda çözünen etkin maddeler için düşük tutma kapasitesine sahiptir (139). Bu nedenle suda çözünen peptit, protein ve diğer makromoleküllerin hapsedilmesine olanak sağlayan S/Y/S emülsiyon oluşturma / çözücü buharlaştırma yöntemi geliştirilmiştir (108, 136,140).

2.3.3. Polimerizasyon Yöntemleri

Misel Polimerizasyonu: Yöntemin esasını, akrilamid gibi suda çözünen bir monomer ile dış faz olarak bir hidrokarbonun kullanılması oluşturur. Yöntemin aşamaları ise miselizasyon, polimerizasyon, saflaştırma ve ayırmadır. Suda çözünen polimerize edilecek olan monomerler ve kaplanacak maddeler suda çözündürülür. Bu çözelti, yüzey etkin maddeler yardımıyla hidrofobik fazda dağıtılır ve miseller elde edilir. Polimerizasyon başlatıcısı olarak x-ışını, IR ışını gibi bir enerji yardımıyla katı tanecikli kolloidal bir sistem elde edilir ve oluşan partiküller ultrasantrifüj ile ayrılır (108).

Emülsiyon Polimerizasyonu: Emülsiyon polimerizasyonu yönteminde, polimerizasyon işlemi emülgatör maddelerin oluşturduğu miseller içinde gerçekleşir. Dispersiyon ortamındaki monomer damlacıklarından miseller içine difüze olan monomer molekülleri, dispersiyon ortamında çözünür ve sıcaklığın arttırılmasıyla aktif duruma geçer ve daha sonra misel içine göç etmiş başlatıcı moleküllerin etkisiyle polimerleşir. Polimerizasyon monomer damlacıkları tamamen yok olana kadar devam eder. Suda çözündürülen veya dağıtılan etkin madde yağ fazı içinde dağıtılır. Düşük sıcaklıkta eklenen monomerler ara yüzeyde hızla polimerleşerek mikroküre oluşturur. Bu yöntemle 25-250 µm boyutlarında mikroküreler hazırlanabilmektedir (108, 141).

Sulu Ortamda Polimerizasyon: Misel polimerizasyonu yöntemi için fazla miktarda hidrokarbon ve yüzey etkin madde gerekmektedir. Bu nedenle bazı etkin madde ve antijenler için uygun olmadığından sulu ortamda polimerizasyon yöntemi geliştirilmiştir (108).

2.3.4. Faz ayrımı (Koaservasyon) Yöntemi

Koaservasyon yöntemi, suda çözünebilen etkin maddelerin mikrokürelerinin hazırlanması için uygundur. Son yıllarda özellikle peptit, protein ve aşuların mikrokürelerinin hazırlanmasında tercih edilmektedir (125,142). Bu yöntemde polimer uygun bir çözücüde çözündürülür ve sonra hazırlanan bu çözeltide fiziksel bir değişim yapılarak iki fazlı bir sistem oluşturulur. Bu değişim, ortama polimer-çözücü etkileşimini azaltan çöktürücü bir madde ilavesi ile gerçekleştirilir. Sıcaklık, pH, iyonik güç, v.b. etkenler bu faz değişimine yol açabilir (143,144).

2.3.5. Dispers Fazda Jelleşme ve Çapraz Bağlanma Yöntemi

Bu yöntem, esas olarak jelatin, albumin, nişasta gibi doğal polimerler ile mikroküre hazırlanması için kullanılır. Doğal polimer ve etkin madde su fazı içinde dağıtılır veya çözündürülür. Etkin madde ve polimeri taşıyan sulu faz, emülgatör içeren yağ fazında dağıtılır (145,146,147).

Yağ fazı olarak, bitkisel yağlar (zeytinyağı, ayçiçek yağı, susam yağı, hint yağı) veya sıvı parafin kullanılmaktadır (148). Sistem soğutulup, ısıtılır veya çapraz bağlayıcılar ilave edilerek, polimerin jelleşmesi, denatüre olması veya çapraz bağ oluşması sağlanır. Yağ fazı aseton, kloroform, alkol gibi çözücüler kullanılarak uzaklaştırılır (147,149).

2.3.6. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) Yöntemi

Dondurarak kurutma yönteminde, hazırlanan emülsiyonların soğutulması ve susuz sürekli faz ve ayrıca emülsiyon karıştırılırken dağılmış faz damlalarının sertleşmesini sağlamak için çok düşük sıcaklık gereklidir. Sıcaklık, sürekli fazın sertleşmesini sağlamak için daha da düşürülür ve dondurulan sürekli faz, kurutma yöntemiyle uzaklaştırılır. Daha sonra sıcaklık artırılır ve dağılmış faz içindeki çözücü uzaklaştırılarak mikroküreler elde edilir. Bu yöntemde verim yüksek olmasına rağmen hazırlama süresi oldukça uzundur. Polimer çözücüsü, sürekli fazdan daha yüksek erime noktasına sahip olmalıdır, fakat bunun başarılması oldukça zordur (150).

2.3.7. Sıvılaştırılmış Yatakta Kaplama Yöntemi

Sıvılaştırılmış yatakta kaplama yönteminde Würster apareyi kullanılır. Yöntemin esası akışkan mineral yağa, polimer-etkin madde çözeltisinin sürekli püskürtülmesine dayanır (151-153).

2.4. Mikroküre Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Polimerler, en basit tanımıyla, çok sayıda aynı veya farklı atomların kimyasal bağlarla, az veya çok düzenli bir biçimde bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir (108).

Etkin madde taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan polimerler, biyolojik olarak parçalanmayan ve parçalanmayan polimerler olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilir (154).

Biyolojik Olarak Parçalanmayan Polimerler:

Etkin madde taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan biyolojik olarak parçalanmayan polimerler arasında büyük bir grubu oluşturan hidrojeller kısaltmaları ile birlikte Tablo 1. de verilmiştir (154).

Bunların dışında vücutta parçalanmayan hidrofob yapıda polimerler de mevcuttur. Bu tip polimerler suda çözünmez ve suda şişmezler. Bu gruba örnek olarak; silikonlar ve poli (etilen vinil asetat) kopolimeri verilebilir.

Biyolojik Olarak Parçalanabilen Polimerler:

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler suda çözünmezler fakat biyolojik sıvılarla temas ettiklerinde kimyasal ve fiziksel değişime uğrarlar. Bu grup polimerlerin *in vivo* parçalanma mekanizması, enzimlerin rol aldığı “hidrolitik parçalanma”dır. Polimerlerin hidrolitik olarak parçalanmasını polimerin su geçirgenliği, kimyasal yapısı,

molekül ağırlığı, camsı geçiş sıcaklığı, morfolojisi, sisteme ilave edilen katkı maddeleri, kullanılan sistemin şekli, çevresel faktörler, hidroliz mekanizması, parçalanma ortamının pH sı, iyonik gerilim ve sıcaklığı gibi pek çok parametre etkilemektedir (109)

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler de, doğal ve sentetik olarak iki gruba ayrılır (154) (Tablo 2).

Tablo 1: Biyolojik olarak parçalanmayan hidrojel

PHEMA	Poli(hidroksi etil metakrilat)
PHEEMA	Poli(hidroksietoksi etil metakrilat)
PHDEEMA	Poli(hidroksidietoksietil metakrilat)
PMEMA	Poli(metoksietil metakrilat)
PMEEMA	Poli(metoksietoksietil metakrilat)
PMDEEMA	Poli(metoksidietoksietil metakrilat)
PEGDMA	Poli(etilen glikol dimetakrilat)
PNVP	Poli(N-vinil-2-pirolidon)
PNIPAAm	Poli(N-izopropil akrilamit)
PVAc	Poli(vinil asetat)
PAA	Poli(akrilik asit)
PMAA	Poli(metakrilik asit)
PHPMA	Poli(N-2-hidroksipropil metakrilamit)
PEG	Poli(etilen glikol)
PEGA	Poli(etilen glikol akrilat)
PEGMA	Poli(etilen glikol metakrilat)
PEGDA	Poli(etilen glikol diakrilat)
PEGDMA	Poli(etilen glikol dimetakrilat)

Tablo 2: Biyolojik olarak parçalanabilen doğal ve sentetik polimerler

Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Albumin	Poli (α -amino asitler)
Kollajen ve Jelatin	Poli (ϵ -kaprolakton)
Kitin ve Kitozan	Poli (orto esterler)
Fibrinojen	Poli (anhidritler)
Dekstran	Poli (alkil 2- siyanoakrilatlar)
Aljinat	Poli (laktik asit)
Selüloz ve Nişasta	Poli (glikolik asit)

2.5. PLA, PLGA ve Laktid/Glikolit Kopolimerleri ile Yapılan Çalışmalar

Vücutta parçalanabilen polimerler vücutta kimyasal reaksiyonlarla suda çözünebilir hale dönüştürülebilirler. Biyolojik olarak parçalanabilen poliesterler, toksik olmayan, dokulara zararlı etkisi olmayan, aşınabilir matriks materyalidir ve cerrahi malzemeler dahil olmak üzere birçok biyomateryal uygulamalarında başarıyla kullanılmaktadır (155).

PLA, PLGA ve laktid/glikolid kopolimerleri, hidroliz yoluyla doğal metabolik bileşikleri olan asit bileşenlerine parçalanırlar ve başlıca parçalanma ürünleri, karbondioksit ve sudur, bunlar da Krebs siklusu aracılığıyla idrar ile atılır (109,137).

Laktid/glikolid polimerlerin en önemli üstünlüğü, polimer özelliklerinin ve performanslarının çok yönlü olmasıdır. Poli(laktik), poli(glikolik) polimerlerin çok yönlü kullanımlarının nedenleri arasında, enjeksiyon ve ve implant sistemleri şeklinde üretiminin kolay olması (109,110), çoğunun yaygın olarak kullanılan birçok çözücüde çözünebilmesi ve hidrofilik ve biyolojik olarak parçalanabilirlik özelliklerinin uygun laktid/glikolid oranları seçilerek değiştirilebilmesi (109,155), FDA tarafından insanlar üzerinde kullanımına izin verilmiş olması yer alır. Laktid/glikolid polimerleri ile hazırlanan sistemlerde etkin madde geçirgenliği yavaş olduğundan salım, günler, haftalar hatta aylar boyunca sürebilir. Bu polimerlerden ilaç, difüzyon ve aşınma mekanizmalarının birleşimi ile salınır (142,156). PLA ve PLGA mikro- veya nanopartiküllerinden etkin madde salımı aşağıdaki sıra ile gerçekleşir (156).

- Polimer yüzeyinde kalan kaplanmayan etkin maddenin salımı
- Partikül porlarından difüzyon
- Dokunulmamış polimerden difüzyon
- Suda şişen polimerden difüzyon
- Polimer matriksten yüzey veya hacimsel erozyon

Polimerin molekül ağırlığı ve kullanılan kosolvan miktarı mikrokürelerin gözenekliliği üzerine etkilidir. Polimerin molekül ağırlığı arttıkça polimer çözeltisinin viskozitesinin artması nedeniyle çözücü ekstraksiyonu damlacık oluşumundan önce gerçekleşir. Böylece daha az gözenekli mikroküreler oluşur. Gözenekli yapıya sahip mikroküreler etkin maddeyi daha hızlı salarlar. Bu şekilde molekül ağırlığı azaldıkça salım hızının arttığı saptanmıştır (109). Ueda ve ark. (157) yaptıkları bir çalışmada ise farklı molekül ağırlıklarına sahip iki tip PLA kullanılarak nanopartiküller hazırlanmışlardır. Formülasyonlara sorbitan yağ asidi esterleri ilavesi yapıldığında düşük molekül ağırlıklı PLA ile hazırlanan mikrokürelerin etkin madde tutma kapasitesindeki artış, yüksek molekül ağırlıklı PLA ile hazırlanan mikrokürelere göre yüksek bulunmuştur.

Son yıllarda, peptit ve proteinlerin, PLA ve PLGA polimerleri ile mikrokürelerinin hazırlanması üzerine pekçok çalışma mevcuttur (109,112,158). İnterferon (158), heparin (159,160), insülin (140) gibi protein yapısında etkin maddelerin PLA ve PLGA ile hazırlanan mikrokürelerinin uzun süreli *in vitro* salım profili gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca bu polimerler kullanılarak aşı formülasyonları geliştirilmiştir (110). PLA ve PLGA ile hazırlanan enjektabl mikrokürelerinin parenteral yolla verilmesi ise oldukça kolaydır (110,161,162).

PLA ve PLGA ile hazırlanan mikroküreler genelde düzgün yüzeyli, küresel ve oldukça küçük partikül boyutuna sahiptir (137). Mikrokürelerin partikül boyutlarının küçük olması ve vücutta parçalanabilen yapıda olmaları nedeniyle nazal uygulamaya oldukça uygun olduğu vurgulanmaktadır (58). Tetanoz toksoidi (163), *Yersinia pestis* antijeni (158) yüklü PLA mikroküreleriyle nazal aşılama çalışmaları yapılmıştır. Çiftçi ve ark. (164) tarafından 5-FU taşıyan PLGA mikroküreleri hazırlanarak yapılan bir çalışmada 4 µm den küçük partikül büyüklüğüne sahip mikrokürelerin karaciğerde lokalize edilebileceği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise sisplatin içeren PLGA mikrokürelerinin beyine direkt olarak injeksiyonu ile de sisplatinin bir aydan uzun bir

süre sürekli salımının sağlandığı ve bu yöntemin beyin tümörlerine lokal ilaç taşımada kullanılabileceği belirtilmektedir (165).

PLA ile hazırlanan mikrokürelerin polimer yüzeyinde kalan kaplanmayan etkin maddenin ilk saatlerde hızlı salımıyla “patlama etkisi” (burst effect) görülen çalışmalar da mevcuttur (158,159,166,167). Witschi ve ark. (112) yaptıkları bir çalışmada; püskürterek kurutma, S/Y/S çözücü uçurma ve çözücü ekstraksiyon yöntemleri ile farklı molekül ağırlıklarında L-PLA ve DL-PLGA polimerleri kullanılarak mikroküre formülasyonları hazırlanmıştır. İn vitro salım testlerinde mikroküre hazırlama yöntemlerinin patlama etkisi üzerine etkili olduğu; çözücü ekstraksiyon < püskürterek kurutma < S/Y/S çözücü uçurma yöntemlerinin sırasıyla patlama etkisinin arttığı saptanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada düşük molekül ağırlıklı PLGA ile hazırlanan mikrokürelerin in vitro salımında patlama etkisi görülmezken yüksek molekül ağırlıklı PLA ve PLGA ile hazırlanan mikrokürelerin in vitro salımında patlama etkisi saptanmıştır.

2.6. Mikrokürelerin Kullanım Alanları

Mikroküreler pek çok alanda kullanılmaktadır (108, 168, 169).

- Kontrollü etkin madde serbestleştiren sistemlerin hazırlanması
- Radyoaktif madde ile işaretlenerek teşhis işlemleri
- Reolojik araştırmalar
- Ayırma işlemleri
- Biyolojik etkinliğe sahip maddelerin immobilizasyonu
- Elektron ve ışık mikroskoplarında, partikül ve hücre sayaçlarında kalibrasyon işlemleri
- Hücre kültürlerinde taşıyıcı ve hücre çalışmalarında işaretleyici olarak
- Kromatografi kolonlarında kolon dolgu maddesi olarak
- Aglütinasyon testlerinde işaretleme amacıyla
- Radyoimmünojenik tayin ve diğer immünojenik test ve araştırmalarda kullanılır.

2.7. Heparin İçeren Partiküler Sistemler

Literatürde heparin içeren partiküler sistemlerin uygulandığı çalışmalar mevcuttur.

Kreitz ve ark. (167) tarafından yapılan bir çalışmada, PLGA 50:50 polimeri ile püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerden heparinin in vitro salım hızı incelendiğinde, ilk dört saatte patlama etkisi olduğu ve etkin madde salımının 12 hafta srdğu saptanmıştır.

Yang ve ark. (170) yaptıkları çalışmada, polimer olarak PLGA 50:50 (Resomer RG 502) ve PLGA 75:25 (Resomer RG 752) kullanılan ve püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan heparin mikrokürelerinin partikül boyutunun 10 μm den kk olduğu ve her iki polimer ile hazırlanan mikrokürelerin farklı salım profilleri verdiği saptanmıştır. Özellikle PLGA 75:25 ile hazırlanan mikrokürelerden heparin salımı 60 gün srmştir. Bu polimerden heparinin %25 i ilk 2 günde patlama etkisi ile ağa çıkmıştır. PLGA 50:50 ile hazırlanan mikrokrelerde salımın ikinci aşaması olan hareketsiz aşama 15 günden az sürerken, PLGA 75:25 de 30 gün srdğu saptanmıştır.

Diğer bir çalışmada, vücutta parçalanabilen poly- ϵ -kaprolakton (PCL) ve PLGA polimerleri ile vücutta parçalanamayan Eudragit RS ve RL pozitif yüklü polimerleri kullanılarak heparin nanopartikülleri hazırlanmıştır ve nanopartiküller üzerinde in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmıştır (171). Eudragit RS ve RL; PCL ve PLGA ile karışım halinde kullanıldığında mikrokürelere heparin yüklenmesi PCL ve PLGA nın yalnız kullanılmasından daha yüksek olmuştur. Buna rağmen Eudragitlerin, PCL ve PLGA ile birlikte veya yalnız kullanılmasıyla hazırlanan nanopartiküllerden etkin madde salım hızının düşük olduğu saptanmıştır. İn vivo deneyler için, nanopartiküller oral olarak tavşanlara 600 IU/kg dozda uygulanmış ve anti-Xa ile aPTT ölümleri yapılmıştır. Özellikle Eudragit RC ve PCL nanopartiküllerinin aPTT süresini anlamlı lde uzattığı ve mutlak biyoyararlanımın %23 olduğu saptanmıştır.

Edelman ve ark. (172) yaptığı bir çalışmada, PLGA 50:50 ve PLGA 70:30 polimeri ile heparin mikroküreleri çift emülsiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiş ve mikroküre çaplarının ortalama 104 μm olduğu saptanmıştır. PLGA 50:50 polimeri ile elde edilen mikrokürelerin %18 patlama etkisi gösterdiği ve in vitro heparin salımının 69 gün srdğu, PLGA 70:30 polimeri ile elde edilen mikrokürelerin ise %10 patlama etkisi gösterdiği ve salımın 14 gün srdğu kayıt edilmiştir.

Yildiz ve ark. (173) yaptığı çalışmada heparin yüklü PLA mikroküreleri elde edilmiş ve nazal yoldan antikoagülan etkileri sıçanlar üzerinde in vivo değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada heparin yüklü mikrokürelerin heparin çözeltisine göre uzun süreli etki sağladığı ve biyoyararlanımın daha fazla olduğu görülmüştür.

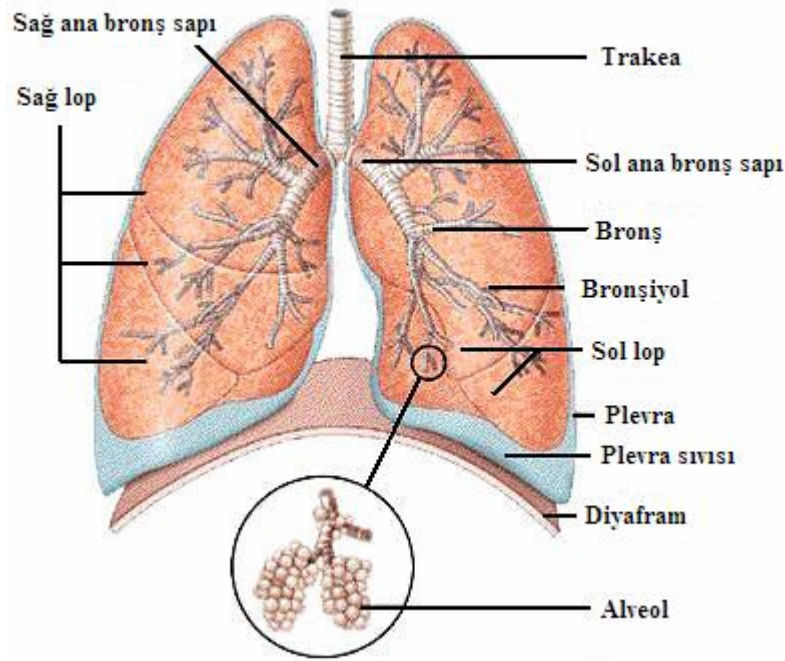
Heparinin in vitro salım çalışmalarında miktar tayini yöntemi olarak Azur A reaktifi ile spektrofotometrik (167,170) ve işaretlenmiş ³H-Heparin kullanılan radyolojik (172) yöntemler bulunmaktadır. Ayrıca, Jiao ve ark. (63), heparin yüklü mikrokürelerden in vitro salım çalışmalarında miktar tayini için Diagnostica Stago'nun standart kitleri kullanarak antifaktör X_a aktivitesini hesaplamışlardır.

3. PULMONER YOL İLE İLAÇ UYGULANMASI

3.1. Solunum Yolu Anatomisi ve Fizyolojisi

Solunum sisteminin en büyük fonksiyonu kana oksijen sağlamak ve vücuttan karbondioksiti uzaklaştırmaktır (174).

İnsanlarda solunum sistemi üst ve alt solunum yolu olarak ayrılır.



Şekil 1: Solunum yolu anlatımı

Üst solunum yolu; burun, burun boşluğu, paranasal boşluk, ağız, östaki borusu, farinks, özafagus ve larinksten oluşur. Trakea ve bronşlar bazen üst solunum yoluna dahil edilirler. Alt solunum yolu; örneğin havayolu ve alveoller gibi solunum dokusunu içerir (Şekil 1) (175).

Üst Solunum Yolu: Burun giren havanın nemlendirilmesi, filtrasyonu ve ısıtılması görevini yerine getirir. Aynı zamanda burun gazların giriş kısmıdır, birçok insan özellikle stres durumunda ağızdan nefes alır. Bu nedenle nazal korunma yolu kaybolur. Bundan dolayı akciğer hava durumu mekanizması ve yabancı partiküllerin uzaklaştırılmasından sorumludur.

Nazofarinks burundan oral farinkse hava ve salgıların geçiş yoludur.

Larinks kompleks yapıda iki fonksiyonu olan bir organdır. Akciğerlerdeki hava kanalını ve fonatığını kontrol eder.

Alt Solunum Yolu:

Trakea:Trake yetişkinlerde 11-13 cm uzunluğunda ve 1,5-2,5 cm çapındadır ve sağ ve sol bronş şeklinde iki kola ayrılır. Sağ bronş üst, orta ve alt dallara ayrılırken sol bronş sadece alt ve üst dallara ayrılır (176).

Trakeabronşiyal ağaç:Trakeabronşiyal ağacın her bir dalı yeni jenerasyon tüpler üretir. Ana bronş ilk jenerasyondur, bunu izleyen ikinci ve üçüncü bronş lobar ve segmentel bronşdur. Dört ile dokuz jenerasyon aralığında küçük bronşlar vardır ve bunların çapları 4 mm den 1 mm ye azalır. Çapı 1 mm den küçük olanlar lobların içine girer bronşiyol terimi adını alır. Bu kısım havayolu ile gelen gaz değişiminin yapıldığı kısımdır (175).

Akciğerler: Akciğer sağ ve sol olmak üzere büyük kısmı intratorakik alanda olan eşit olmayan iki kısma ayrılmış bir organdır. Sağ akciğer tüm akciğerlerin %56 lık kısmı oluşturur, ön, orta ve arka olmak üzere üç lobdan oluşur bu loblar horizontal ve yatay derin ince çatlaklar içerir. Sol akciğer yatay derin çatlaklar içeren iki lobdan oluşur ve kalbin asimetrik duruşu nedeniyle daha küçük hacim kaplar (174).

Solunum gazları karşılıklı olarak havadan 140 m^2 iç yüzey alanına sahip doku kompartmanlarından kana geçerler. Gaz değişiminin olduğu dokulara akciğer parankiması denir ve iletilen hava, lenfler, kapiler olmayan kan damarları parankima olmayan kısmı oluşturur. Akciğerlerdeki parankimalar herbiri 3.5 mm olan 130 000 lobdan oluşur ve 2200 alveol içerir. İnsan akciğerinde 300 milyon alveol vardır. Akciğerlerin hava hacmi 4,8 L, total solunum nokta hacmi 3,15 L ve toplam alveolar hava dokusu ara yüzeyi 81 m^2 dir (176).

3.2. Solunum Yolu Hastalıkları

3.2.1. Havayolu Aşırı Cevaplılığı (Bronşiyal Aşırı Hassasiyeti):

Değişik fiziksel, kimyasal ve farmakolojik uyaranlara karşı hava yollarında oluşan abartılı (çok çabuk ve çok şiddetli) bronkokonstrüktör yanıt, havayolu aşırı cevaplılığı (HAC) olarak tanımlanmaktadır (5). HAC, astımın tipik bir özelliğidir. HAC in derecesi, havayolu inflamasyonunun derecesi, astım semptomları ve bronkodilatör tedaviye gereksinim ile yakından ilişkilidir (177). HAC gelişiminin ana nedeni havayolu inflamasyonudur. Havayolu inflamasyonu nedeniyle lumen çapının daralması (mikroalbuminsküler sızıntı ve mukozal ödem, bronş düz kaslarında hipertrofi, subepitelyal fibrozis) ve epitel hasarının yol açtığı sonuçlar HAC gelişiminde rol

oyunmaktadır. Antiinflamatuvar ilaçlar havayolu aşırı cevaplılığını azaltabilirken, bronkodilatör ilaçlarda benzer etki görülmemektedir (178).

Değişik uyaranlar hava yollarını doğrudan veya dolaylı olarak etkileyerek hızlı ve çabuk havayolu daralmasına neden olmaktadır. Doğrudan etki gösterenler (histamin ve metakolin), havayolu düz kası üzerinde bulunan reseptörleri uyararak bronkokonstrüksiyon oluşturmaktadırlar. Dolaylı olarak etki gösterenler ise, ya mast hücreleri gibi mediatör sekrete eden hücreleri uyararak (egzersiz, hipertonic veya hipotonik uyarılar), ya da havayolu epitelinde bulunan miyelinsiz duyuşal sinirleri uyararak (sülfürdioksit, bradikinin gibi) farmakolojik olarak aktif maddelerin salınmasına neden olmakta ve böylece bronkokonstrüksiyon gelişimine yol açmaktadırlar (6). Bazı uyaranlar ise her iki mekanizma ile etki göstermektedir. Alerjik uyarılar ise, HAC dan bağımsız olarak sadece allerjene duyarlılaşmış kişilerde havayolu daralmasına neden olmaktadır. O nedenle, astıma özgü tek bir uyarandan söz etmek güçtür (179). KOAH gibi, anormal hava yollarına sahip hastalıklarda da dolaylı etkiye sahip uyaranlar etkili olabilmekte ve HAC gelişebilmektedir (180).

Değişken Hava Akımı Obstrüksiyonu:

Hava akımı obstrüksiyonundaki değişkenlik havayolu aşırı cevaplılığındaki değişkenlik veya dalgalanma ile yakından ilişkilidir (181).

Astım:

Günümüzde astım, aşağıdaki temel özellikleri ile tanımlanmaktadır:

Astım, hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Bu inflamasyonda birçok hücre, özellikle mast hücreleri, eozinofiller ve T lenfositler önemli bir role sahiptirler (179).

Havayolu inflamasyonu, hava yollarının değişik uyaranlara karşı aşırı cevaplılığına (bronşiyal hiperreaktivite) ve yaygın, değişken hava akımı obstrüksiyonuna neden olmaktadır (182). Hava akımı obstrüksiyonu kendiliğinden veya tedavi ile kısmen düzelebilmektedir.

Havayolu inflamasyonu ve buna ikincil gelişen/fonksiyonel değişiklikler astıma özgü semptomların oluşmasına yol açmaktadır. Astımda görülen temel semptomlar; nöbetler tarzında gelişen hırıltılı solunum, nefes darlığı, göğüsde sıkışma ve öksürüktür. Bu semptomlar, genellikle geceleri veya sabah erken saatlerde oluşur (183).

Tüm yaş gruplarında görülebilen, şiddetli bazen de öldürücü olabilen bu hastalık, dünyada yaklaşık 100 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir (184).

Astım Patojenezi: Son yıllarda elde edilen bilgiler, astmatik hava yollarında çok sayıda aktive olmuş inflamatuvar hücrelerin bulunduğunu, bu hücrelerden çok sayıda mediatörlerin (inflamatuvar mediatörler ve sitokinler) salındığını, bu mediatörlerin havayollarındaki hedef hücreler üzerinde değişik etkiler oluşturarak astım için tipik olan patofizyolojik özelliklerin oluşmasına neden olduğunu göstermektedir (179).

Kronik Havayolu İnflamasyonu: Astımda havayolu inflamasyonunun hangi mekanizmalarla geliştiği konusunda çok kesin olmasada inflamasyonun aşağıdaki süreçlerde geliştiği düşünülmektedir (177) (Tablo 3).

A. İnflamasyonun başlatılması

- IgE aracılıklı ve T lenfosit aracılıklı mekanizma
- IgE den bağımsız, T lenfosit aracılıklı mekanizma

B. İnflamatuvar hücrelerin havayollarında toplanması ve aktivasyonu

C. İnflamasyonun havayolundaki hedef hücreler üzerindeki etkileri:

- Havayolu epiteli üzerindeki etkileri: İnflamatuvar hücrelerden salınan inflamatuvar mediatörler (özellikle eozinofillerden salınan major basık protein ve eozinofilik katyonik protein) oksijen kökenli serbest radikaller, nitrik oksit (NO) ve inflamatuvar hücrelerden salınan değişik proteazlar havayolu epitel hücrelerinde hasara ve dökülmeye neden olmaktadır.
- Fibrozis
- Vasküler yanıtlar
- Plazmanın damar dışına çıkışı ve mukozal ödem
- Mukus hipersekresyonu
- Havayolu düz kası
- Nöral etki
- İnflamasyonun sinir sistemine etkileri
- Nörojenik inflamasyon
- İnflamasyonun çözülmesi

Tablo 3: Havayolu inflamasyonuna katılan inflamatuvar hücreler, bu hücrelerden salınan inflamatuvar mediatörler ve inflamatuvar sürecin havayolundaki hücrelere etkileri

Havayolundaki etkileri	İnflamatuvar Mediatörler	İnflamatuvar Hücreler
A. Yapısal değişiklikler		
Epitel dökülmesi	Histamin	Mast hücreler
Subepitelyal fibrozis	Lökotrienler(LT)	Makrofajlar
Vasodilatasyon	Progtoglandinler(PG)	Eozinofiller
Plazma eksudasyonu ve ödem →	Tromboksan (TX)	→ T lenfositler
Mukus hipersekresyonu	PAF	Epitel hücreler
Bronkokonstrüksiyon	Bradikinin	Fibroblastlar
Düz kas hipertrofisi	Taşikininler(SP,NKA)	Nöronlar
Nöral etkiler	Reaktif oksijen tüpleri	Nötrofiller
Havayolu şeklinde değişme	Adenozin	Trombositler
	Endotelinler	Bazofiller
B. Fonksiyonel Sonuçlar	Sitokinler	
Havayolu aşırı cevaplılığı	Büyüme faktörleri	
Değişken hava akımı obstrüksiyonu		

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH):

KOAH, kronik bronşit ve amfizeme bağlı olarak gelişen hava akımı obstrüksiyonunun varlığı ile karakterize bir hastalıktır; hava akımı obstrüksiyonu genellikle progressiftir, havayolu aşırı hassasiyeti ile birlikte veya kısmen reversibl olabilir (185).

3.2.2. Kullanılan İlaçlar

Standart astım tedavisi için önerilen ilaçlar; Ulusal Kalp Akciğer ve Kan Enstitüsünün 1999 da yayınlanan kılavuzunda yer aldığı şekliyle Tablo 4 de verilmiştir. Bu maddeler astım semptomlarının kontrollünde genellikle başarılı olmasına rağmen bir kısım hasta grubunda semptomların devam ettiği gözlenmiştir. Ayrıca oral veya yüksek dozda kullanılan inhale kortikosteroidler de önemli yan etkilere sahiptir. Ayrıca Afrika-

Amerikan ırkında steroid-direnci bulguları nedeniyle astımda alternatif ilaç arayışlarının da devam ettiği bildirilmiştir (178).

Tablo 4: Havayolu aşırı duyarlılığında kullanılan ilaçlar

Tedavide Kullanılan Geleneksel İlaçlar		Tedavide Kullanılan Alternatif İlaçlar
Antienflamatuvar İlaçlar	Bronkodilatör İlaçlar	Metotreksat
Kortikosteroidler (oral ve parantral)	Beta-2 Agonistler(Kısa etkili İnhalasyon)	Troleandomisin
Sodyum Kromoglikat	Beta-2 Agonistler(Uzun etkili İnhalasyon)	Altın
Nedokromil sodyum	Teofilin	Hidroksiklorokin
Diğer antiallerjik bileşikler	Antikolinergikler	Azatioprin
		Siklosporin
		IVIg
		Inhalasyon heparin
		Inhalasyon furosemid
		Dapson

3.3. Pulmoner Yol ile İlaçların Uygulanması ve Emilim Mekanizmaları

Akciğerlere ilaç verilmesi ve teknolojisi bu yüzyılın son 25 yılında önemli bir şekilde ilerleme göstermiştir. Bugün pulmoner hastalıkların tedavisi daha hızlı ve daha etkili olmaktadır. Astım, allerji, yetişkinlerde solunum sıkıntısı ve kronik obstrüktif pulmoner hastalıklar inhalasyon yolu ile tedavi edilebilmektedir. Pulmoner yolla lokal etki sağlanabildiği gibi, akciğerin büyük yüzey alanı, ince alveoler epiteli ve düşük enzimatik aktivite göstermesi nedeniyle sistemik etki sağlanabilmektedir. Aynı zamanda, solunum bölgesinin anatomik yapısı immün cevabın oluşması için uygun bir

yoldur. Son yıllarda özellikle peptit ve proteinlerin pulmoner yoldan uygulanmaları önem kazanmış olup bu konu ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

İlaçların pulmoner yoldan verilisinde biyoyararlanım sorunu ortaya çıkabilir. İn hale edilen partiküllerin akciğerde tutulmasını (depozisyonu) etkileyen faktörlerin başında, partikül büyüklükleri, şekilleri, dansiteleri ve yükleri gelmektedir. Ayrıca etkin maddenin çözünürlük, partiyon katsayısı, permeabilitesi, molekül ağırlığı, enzimatik stabilitesi gibi fizikokimyasal özellikleri ve formülasyon şekli, biyofiziksel parametreler ve kullanılan aletler inhale edilen ilacın biyoyararlılığını etkilemektedir (186).

Alveoler hücrelerin yaklaşık olarak %97 si 5 µm kalınlığındaki tip I hücrelerdir. Tip II hücreler ise, 10-15 µm kalınlığında olup, akciğerler için oldukça önemli olan yüzey etkin madde salgılar. Akciğer yüzey etkin maddesinin bileşimi fosfolipitler özellikle fosfotidilkolin ve fosfotidil gliseroldür (187). Akciğerin yüzey etkin madde karışımı alveoler üzerinde monomolekül bir film oluşturur ve pulmoner ödemi önler ve enfeksiyonlara karşı direnç gösterir (188).

İlaçların akciğerlerden emilimi hem pasif difüzyon hem de aktif endositoz ile gerçekleşmektedir (187). Genel olarak lipofilik bileşiklerin akciğerden emilimi etkin maddenin dağılım katsayısına bağlıdır. Hidrofilik bileşiklerin çoğunluğu biyolojik membranlardaki porlardan molekül ağırlıklarına bağlı olarak difüzyonla emilirler. Yüksek molekül ağırlığındaki bileşikler porlardan zor geçerler. Bazı bileşiklerin, örneğin fenol kırmızısı, sodyum kromoglikatın taşıyıcı aracılığı ile geçtikleri saptanmıştır (189).

3.4. Akciğere İlaç Uygulamasındaki Yaklaşımlar

Akciğere ilaç uygulamasında çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. En çok bilinen iki önemli yöntem, aerosol inhalasyon ve intratrakeal uygulamadır. Aerosol inhalasyon genellikle akciğerin alveoler ve perifer bölgelerinin içine, ilacın fazla miktarda penetre olması ile üniform şeklindeki dağılımının sonucunda oluşur. Ancak teknik olarak pahalı ve komplikedir.

İntratrakeal uygulama küçük miktardaki çözeltinin akciğerin içine bir şırınga ile verilmesidir. İlacın tutulması ile lokal etki sağlanır (187). Ancak dozlamının tekrarlanabilirliği zordur, çünkü şırınga ile uygulama sonucu üniform olmayan dağılım elde edilir.

Aerosoller katı veya sıvı damlacıkların gaz ortamındaki dispersiyonlarıdır. Aerosollerde partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı çok önemlidir. İn hale olan aerosollerde partikül, aerodinamik partikül büyüklüğü olarak tanımlanmaktadır ve herbir partikülün teorik olarak aerodinamik çapı (d_{aer}) aşağıda verilen eşitlik ile hesaplanmaktadır (190).

$$d_{aer} = \sqrt{(\rho/\rho_1) \cdot d}$$

d:Partikül çapı ρ :Tozun dansitesi, ρ_1 :1 g/cm³

Aerosol partiküllerin pulmoner hava yollarında ve akciğerlerde tutulmaları üç mekanizma ile oluşmaktadır (187). Partikül büyüklüklerinin ağırlıklarına göre sedimentasyon, çarpma-vurma ve difüzyondur.

Birinci ve ikinci mekanizma büyük partiküllerin tutulmaları içindir. Difüzyon mekanizması ancak akciğerin periferal bölgelerinde küçük partiküllerin tutulması ile olur. Aerosol partiküllerinin akciğerlerde tutulması solunum fonksiyonuna bağlı olup, partiküllerin aerodinamik büyüklüğü ve dağılımı, dansitesi, yüzey yükü, higroskopik özellikleri, inhalasyonun akış hızı, sıvı damlacıkların tonisitesi gibi faktörler de bağlıdır. Periferal akciğer bölgesinde tutulma yavaştır. Terapötik amaçla kullanılan aerosollerin çoğunluğu geniş partikül büyüklüğü sınırında partiküller içerirler ve heterodisperstirler. Çapları 1-5 μ m olan partiküller, ağırlıkları nedeniyle küçük bronşiyoller içine çökerler. Daha küçük partiküllerin bir kısmı (1 μ m den küçük olanlar) alveol çeperinden difüzyona uğrayarak alveoler sıvıya geçerler. Alveollerde tutulan partiküllerin bir kısmı alveoler makrofajlar tarafından, diğerleri akciğer lenfatikleri yoluyla uzaklaştırılır (191). Aerosol partiküllerin çoğu higroskopiktir. Higroskopik partiküller hızlı bir şekilde su çeker ve ağırlıkları ile boyutları artar (187).

3.5. Pulmoner İlaç Uygulama Sistemleri

Tedavide pulmoner amaçla kullanılan üç tip aerosol sistemi bulunmaktadır:

- Ölçülü doz inhaler
- Kuru toz inhaler
- Nebulizörler (Jet veya ultrasonik nebulizör)

Bir inhalasyon taşıyıcı sisteminin klinikte kullanılabilmesi için kabul edilen kriterler aşağıda belirtilmiştir (192,193).

- Dozlama tekrarlanabilir olmalı,
- Etkin maddenin fiziksel ve kimyasal stabilitesini korumalı,
- Inhale edilen fraksiyon kontrol edilebilmeli,
- Hedefleme ve ilaç dağıtımını kontrol edebilmeli,
- Taşınabilir olmalı,
- Kullanım kolaylığı olmalı,
- 10 µm den daha küçük partikülleri taşıyabilmeli.

3.5.1. Ölçülü Doz İnhaler (ÖDİ)

ÖDİ sistemlerinin taşınabilir olması, dayanıklılığı, uzun raf ömrü, emniyeti, kontaminasyonun olmaması, fiyatının ucuz olması gibi üstünlükleri nedeniyle inhalasyon için geniş kullanım alanı bulunmaktadır (194). Buna karşın dozlamadaki değişkenlik, püskürtücünün hemen uçmasından sonra soğukluk hissi vermesi, akciğerin perifer bölgesinde düşük tutulma gibi sakıncaları da vardır. Genellikle bir ÖDİ sistemi bir aktive edici kısım (actuator), bir ölçülü valf, mikronize ilacı veya çözeltiyi içeren basınçlı bir taşıyıcı kap ve püskürtücü parçalarını içermektedir. Formülasyonlar genellikle çözelti veya süspansiyon şeklindedir.

ÖDİ sistemlerin çalışması için püskürtücü gazlar kullanılır. Püskürtücü gaz, bir enerji kaynağıdır ve hızlı bir şekilde buharlaşan damlacık formlarının valf yardımı ile dışarı atılmasını sağlar. Florokarbonların ozon tabakası üzerindeki etkisi nedeniyle son yıllarda püskürtücü gaz olarak, tetrafluoroetan ve hepta-fluoropropan gibi alternatif gazlar kullanılmaktadır (192).

Püskürtücülerin insan sağlığına ve çevreye zararlı etkileri düşünüldüğünden son zamanlarda elektronik olarak kontrol edilebilen piezoelektrik ÖDİ aletleri geliştirilmiştir (189). Bu alet, bir püskürtmeyi sağlayıcı kısım, ana kap, bir piezoelektrik element ve bir elekten oluşmuştur. Alternatif voltaj kullanarak piezoelektrik element ile sıvı damlasına enerji uygulanır. Oluşan ısı, basıncı artırarak püskürtmeyi sağlar. Püskürtülen damlacık büyüklüğü, ilaç çözeltisinin akış hızına, elek büyüklüğüne, eleğin gözenek büyüklüğü ve sayısına, titreşim enerjisine bağlıdır.

3.5.2. Kuru Toz İnhaler (KTİ)

Bu sistemler genel olarak solunum ile harekete geçerler. KTİ sistemlerinin püskürtücü gaz içermemeleri, formülasyon problemleri taşımamaları ve formülasyonların stabilitelerinin daha iyi olması, kolay çalışması, hastanın kolaylıkla kullanabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bu avantajları yanında doz uniformitesinde problemlerin ortaya çıkması ve aletlerin tasarımının zor olması gibi dezavantajları vardır.

3.5.3. Nebulizörler

Nebulizörlerin, ÖDİ ve KTİ e göre üstünlükleri, normal nefes alma ile ağızdan inhale olabilmeleridir (195). Ayrıca ÖDİ ve KTİ ler içinde formüle edilemeyen etkin maddelerin büyük dozda verilmelerini sağlamaktadırlar. Daha çok, yeni doğan bebeklerin, çocukların ve yatalak hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Nebulizörler ile büyük hacimli çözelti ve süspansiyonların inhalasyonu mümkün olabilmektedir. Ancak çözelti formülasyonları nebulizörler için daha uygundur. Formülasyon seçimi, total kütle çıkışına ve partikül büyüklüğüne göre yapılır. Nebulizör sistemlerde formülasyonun stabilitesi de önemlidir. Özellikle inhale olan aerosol partiküllerin büyüklükleri artan viskozite ile artmaktadır.

Ticari olarak jet ve ultrasonik nebulizörler olmak üzere 2 tip nebulizör piyasadadır.

Jet nebulizörler tek kullanımlık olmalarına rağmen ultrasonik nebulizörler böyle değildir. Ultrasonik nebulizörler enzim ve proteinlerin denatüre olmalarına neden olabilir. Bu nedenle jet nebulizörler peptit ve lipozomların akciğere uygulanmasında da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (195). Ancak hidrofilik etkin maddelerin lipozom içinde tutulmalarını bozabileceği rapor edilmiştir (196).

Ultrasonik nebulizörler ultrasonik enerji kullanarak çalışırlar. Ultrasonik dalgalar yüksek frekansta (100 kHz ve daha yüksek) etki eder ve bir seramik piezoelektrik kristal ile sıvının titreşimi sağlanır. Bu sistemler daha pahalıdır ve bu nedenle jet nebulizörlerden daha az kullanılmaktadır. Süspansiyonların ultrasonik nebulizörlerle uygulanışı da daha zordur.

4. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar günümüzde araştırma çalışmalarının önemli bir yerini tutmaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda (örneğin kanser) belli bir maddenin etkilerini, bir hücre ya da dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak canlı ortamında elde edilebilecek sonuçlara ulaşılabilir (197,198). Hücre kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır. İlk olarak 1885 te Roux embriyonik tavuk hücrelerinin hayvanın vücudunun dışında tuz çözeltisinde canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. Carrel 1913 te hücrelerin aseptik koşullar altında düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süre artabildiklerini göstermiştir. Earle ve arkadaşları 1948 de L hücre serisinden izole ettikleri hücrelerin hücre kültüründe klonlar oluşturduklarını; 1952 de de Gey ve arkadaşları bir insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin sürekli serisini ortaya koymuşlardır ki, bu bugün iyi bilinen HeLa hücre serisi olmuştur. Dünya genelinde süregelen çalışmaların devamında 1986 da Martin ve Evans ile arkadaşları fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini izole ederek kültürünü yapmışlar ve 1998 de Thomson ve Gearhart ile yardımcıları insan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır (199).

4.1. Hücre Kültürü Tanım ve Yöntemleri

Hücre kültürleri primer doku eksplantlarından veya hücre süspansiyonlarından türetilebilir. Primer hücre kültürleri tipik olarak sınırlı bir yaşam süresine sahipken (belli bir bölünme sayısından sonra çoğalma durur), sürekli hücre serileri anormal (kanser hücreleri gibi) veya transformasyona uğratılmış hücre serileridir (200,201).

Tek bir hücre tipi hakkında elde edilebilecek en iyi bilgiyi edinmek için o hücrenin dokudan diğer hücre tiplerinden ayrılarak izole edilmesi gerekir. Bunun sonucunda oluşan homojen hücre popülasyonu ya doğrudan ya da kültür ortamında (besiyeri, *medium*) çoğaltıldıktan sonra analiz edilebilir. Farklı hücre türleri doku süspansiyonundan değişik yöntemlerle ayrılarak (izole edilerek) tipleri belirlenebilir. Değişik hücre türlerinden oluşan bir dokudan tek bir tip hücreleri ayırmak için yapılması gereken ilk işlem, tüm hücreleri bir arada tutan ekstrasellüler matriksi ayırmaktır. Bunun için doku örneği, proteinleri parçalayan tripsin ve kollajenaz gibi

proteolitik enzimler ve hücre adezyonunda rol oynayan kalsiyum iyonunu bağlayan EDTA gibi ajanlarla muamele edilir (202).

Farklı hücre türlerini ayırmak için değişik yöntemler uygulanabilir. Hücrelerin fiziksel özelliklerine göre, örneğin büyük olanlar küçük olanlardan, ağır olanlar hafif olanlardan santrifüj edilerek ayrılabilir. Bir başka yaklaşımın temeli, bazı hücre türlerinin cam ya da plastikten yapılmış yüzeye daha sıkı yapışması özelliğine dayanır. Bu yöntem antikorlar kullanılarak özellikle istenen hücre türünün yüzeye yapışması ve daha sonra da uygun işlemlerle o hücrelerin elde edilmesini sağlayabilir (203).

En gelişmiş hücre ayırıştırma yöntemlerinden birinde özel hücreleri işaretlemek için antikor bağlanmış bir floresan boya kullanılır. Böylece işaretlenmiş hücreler işaretlenmemiş olanlardan elektronik bir floresanla aktive edilmiş hücre ayırıcı kullanılarak ayrılabilir. Böyle makineler saniyede binlerce hücre ayırabilir ve 1000 tane işaretlenmemiş hücrenin içinden bir tane floresanla işaretlenmiş hücreyi ayırabilecek kadar seçicidirler (204).

İnfrared lazer kullanarak da mikroskop altında belli bir hücre topluluğu mikrodiseksiyon yöntemiyle elde edilebilir. Bu yöntem özellikle bir tümör dokusunun çeşitli yerlerinden alınan hücrelerin özelliklerinin belirlenmesinde kullanılabilir (205).

Hangi yöntem kullanılmış olursa olsun belli bir tipteki (*uniform*) hücreler elde edildikten sonra, bunlar hücre kültürü için başlangıç materyalini oluştururlar ve koşulları belirlenmiş bir besiyerinde sayıları hızla arttırılarak bir çok deney için kullanılabilirler (202).

Günümüzde kültürler çoğunlukla dokudan ayırıştırılmış hücre süspansiyonlarından yapılmaktadır. Ancak çoğu doku hücreleri süspansiyon ortamında yaşamaya uyumlu değildirler ve bölünmek, çoğalmak için katı bir yüzeye gereksinim duyarlar. Hücre kültürleri için bu gereksinim plastik doku kültür kaplarının yüzeyi ile karşılanır. Kandan türemiş hücre serileri (lösemi ve lenfoma hücre serileri gibi) süspansiyon besiyerlerinde üremeye eğilimliken, akciğer ve böbrek gibi katı dokulardan türemiş hücre serileri tutunarak tabaka şeklinde üreme eğilimindedirler. Hücrelerin türlerine göre gereksinimleri farklılıklar göstermekle birlikte çoğu hücreler, kültür kapları kollajen veya laminin gibi özel ekstrasellüler matriks yapılarıyla kaplanmazsa çoğalmaz ve farklılaşmazlar (203). Bir organizmanın dokularından doğrudan hazırlanan yani in vitro hücre çoğalması olmaksızın hazırlanan, kültüre primer

kültür denir. Bu hücrelerin kültür kabından alınıp çoğaltılmasıyla elde edilen kültürlerle de sekonder kültür denir. Böylece elde edilen hücreler asıl kökenlerinin özelliklerini yansıtmayı sürdürürler. Örneğin, fibroblastlar kollajen salgılamaya, embriyonik kas hücrelerinden türetilen hücreler kültür ortamında kas lifleri oluşturarak kendiliğinden kasılmaya, sinir hücreleri aksonlarını uzatarak diğer sinir hücreleriyle sinapslar yapmaya, epitel hücreleri de sağlam bir epitelin özelliklerini taşıyan tabakalar oluşturmaya devam ederler (206).

Memeli hücresinin kültürü için gerekli besiyerinin bileşenleri amino asitler, vitaminler, tuzlar, glukoz, antibiyotikler ve serumu (serum kullanılmıyorsa da gerekli proteinleri) kapsar. Bu bileşenler aşağıdaki tabloda (Tablo 5) özetlenmiştir (207, 208).

Tablo 5: Hücre kültürü besiyerinin bileşenleri (Memeli hücresi için) (207)

Amino Asitler	Vitaminler	Tuzlar	Diğerleri	Proteinler (Serum Yerine)
Arjinin	Biotin	NaCl	Glukoz	İnsülin
Sistin	Kolin	KCl	Penisilin	Transferrin
Glutamin	Folat	NaH ₂ PO ₄	Streptomisin	Büyüme faktörleri
Histidin	Nikotinamid	NaHCO ₃	Fenol kırmızısı	
İzolösin	Pantotenat	CaCl ₂	Tam serum	
Lösin	Pridoksal	MgCl ₂		
Lizin	Tiamin			
Metiyonin	Riboflavin			
Fenilalanin				
Treonin				
Triptofan				
Tirozin				
Valin				

Bu besiyerinde glukoz konsantrasyonu 5-10 mM arasındadır. Tüm aminoasitler L formundadır ve bir iki istisna dışında konsantrasyonları 0,1-0,2 mM dır. Vitaminlerin konsantrasyonu ise 100 kat daha az yaklaşık 1 µM dır. Serumun total hacime oranı %10 olarak ayarlanır. Antibiyotikler bakteri üremesini önlemek için ortama katılır. Fenol kırmızısı ortam pH sını 7,4 e ayarlamak için bir gösterge olarak kullanılır. Kaplar 37°C

sıcaklıkta, %5CO₂ ve %95 hava içeren bir atmosferde inkübe edilirler. Serum kullanılmadan kimyasal olarak koşulları belirlenmiş bir besiyerine ise serum yerine hücre çoğalmasını uyaran büyüme faktörleri ve hücreye demir taşıyan transferrin gibi proteinler eklenir (209).

Çoğu omurgalı hücreler kültürde sınırlı sayıda bölünmeden sonra hücre ölümü (*cell senescence*) denilen bir sürece girerek bölünmeyi durdururlar. Örneğin, insan fibroblastları kültürde sadece 25-40 kez kadar bölünürler. Bu olay telomerlerin kısalmasına bağlıdır. İnsan somatik hücreleri telomeraz enziminin yapımını durdurdukları için telomerler kısalmakta ve hücrelerin yaşamı da sınırlı olmaktadır. Bu hücrelere telomeraz enziminin katalitik alt birimini kodlayan bir gen katılmasıyla sonsuz çoğalmaları sağlanabilir ve böylece ölümsüz (*immortalized*) hücre serisi olarak kullanılabilirler (205).

Bununla birlikte bazı insan hücreleri bu işlemle de ölümsüz özelliğini kazanamazlar. Telomerleri uzun olarak kalmasına karşın yine de kültürde sınırlı sayıda bölünmeden sonra bölünmeyi durdururlar. Çünkü kültür ortamının koşulları hücre döngüsünün (*cell cycle*) kontrol noktası mekanizmalarını uyarmakta böylece de hücre döngüsü durmaktadır. Bu kontrol noktası mekanizmasının inaktive edilmesi için tümör yapıcı virüslerden türetilen kanser başlatıcı onkojenler kullanılmaktadır (198).

Hücre serileri kanser hücrelerinden de elde edilebilirler. Ancak bunlar normal hücrelerden farklı özellikler taşırlar. Örneğin, kanser hücre serileri bir yüzeye tutunmadan çoğalabilirler ve kültür kabında çok yüksek bir yoğunluğa ulaşabilirler. Bu özellikler tümör indükleyici bir virüs veya kimyasal madde kullanarak normal hücrelerin değişime uğratılması ile de sağlanabilir. Değişime uğramış veya ölümsüz hücre serileri sıvı azotta (-196°C) saklanabildiği ve çözüldükleri zaman da canlılıklarını korudukları için hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (200). Yaygın olarak kullanılmakta olan hücre serileri ve köken aldıkları dokular Tablo 6 da listelenmiştir. Bir hücre serisindeki tüm hücreler birbirine çok benzemekle birlikte genellikle birebir eş değildirler. Genetik olarak tek tür bir hücre serisi hücre