



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



OSTEOARTRİT TEDAVİSİNDE İNTRAARTİKÜLER UYGULAMA İÇİN MİKROPARTİKÜLER / TERMAL HİDROJEL KOMBİNASYON SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR

Bürde Süheyla SUNAR

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Canan HASÇİÇEK**

**ANKARA
2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OSTEOARTRİT TEDAVİSİNDE İNTRAARTİKÜLER
UYGULAMA İÇİN MİKROPARTİKÜLER / TERMAL
HİDROJEL KOMBİNASYON SİSTEMLERİNİN
HAZIRLANMASINA YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

Bürde Süheyla SUNAR

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Canan HASÇİÇEK**

**ANKARA
2016**

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Osteoartrit Tedavisinde İntraartiküler Uygulama İçin Mikropartikül / Termal Hidrojel Kombinasyon Sistemlerinin Hazırlanmasına Yönelik Çalışmalar" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir / hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma / araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Bürde Süheyla SUNAR

Tarih: 15.07.2016

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında

Bürde Süheyla SUNAR tarafından hazırlanan "Osteoartrit Tedavisinde İntraartiküler Uygulama İçin Mikropartiküler / Termal Hidrojel Kombinasyon Sistemlerinin Hazırlanmasına Yönelik Çalışmalar" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.07.2016



İmza

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı

İmza



Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Üye



İmza

Doç. Dr. Canan HASÇİÇEK

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Üye

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

İmza

Prof. Dr. Zafer KARAER

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Osteoartrit ve Epidemiyolojisi	4
1.2. Osteoartrit Risk Faktörleri	6
1.2.1. Sistemik Risk Faktörleri	7
1.2.1.1. Etnik Köken	7
1.2.1.2. Hormonal Durum ve Kemik Dansitesi	7
1.2.1.3. Beslenme Alışkanlıkları	8
1.2.1.4. Genetik Faktörler	8
1.2.2. Lokal Biyomekanik Risk Faktörleri	9
1.2.2.1. Obezite	9
1.2.2.2. Kıkırdığa Binen Yük	9
1.2.2.3. Akut Eklem Hasarı ve Eklem Deformasyonu	10
1.2.2.4. Mesleki Nedenler	10
1.2.2.5. Spor Faaliyetleri	10
1.3. Sağlıklı Eklem Yapısı ve Fizyolojisi	11
1.3.1. Sinovyal Zar	11
1.3.2. Sinovyal Sıvı	12
1.3.3. Artiküler Kıkırdak	13
1.3.4. Kemik	15
1.4. Osteoartrit Görülen Eklem Yapısı ve Fizyolojisi	15
1.5. Osteoartrit Tedavi Yaklaşımları	16
1.5.1. Nonsteroidal Antiinflatuvar İlaçlar (NSAİİ)	17
1.5.2. NSAİİ'lerin Eklem İçi Enjeksiyonu	19
1.5.2.1. NSAİİ'lerin İntraartiküler Uygulamasını Sınırlayan Unsurlar	21
1.5.2.2. Eklem İçine Uygulanan Modifiye Salım Sistemler	21
1.5.3. Tenoksikam	26
1.5.3.1. Tenoksikamın Fizikokimyasal Özellikleri	26
1.5.3.2. Tenoksikamın Farmakodinamik Özellikleri	26
1.5.3.3. Tenoksikamın Farmakokinetik Özellikleri	27
1.5.3.4. Tenoksikamın Endikasyonları	28
1.5.3.5. Tenoksikamın İntraartiküler Kullanımı	28
1.5.4. Kitozan	30
1.5.4.1. Kitozan Eldesi ve Fizikokimyasal Özellikleri	30
1.5.4.2. Kitozanın Farmasötik Alanda Kullanımı	31
1.5.4.3. Kitozan Mikropartiküller	33
1.5.4.4. Kitozan Bazlı Termojeller	36

1.5.5. Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)	39
1.5.5.1. PLGA Eldesi ve Genel Özellikleri	39
1.5.5.2. PLGA Mikropartikülleri	40
2. GEREÇ VE YÖNTEM	42
2.1. Kullanılan Aletler ve Kimyasal Maddeler	42
2.1.1. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	42
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	44
2.1.3. Tenoksikamın Özelliklerinin Belirlenmesi	45
2.1.3.1. Tenoksikamın Analizlerinde Kullanılacak Tampon Çözeltinin Hazırlanması	45
2.1.3.2. Tenoksikamın Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması	45
2.1.3.3. Tenoksikamın Kalibrasyon Denklemine Belirlenmesi	45
2.1.3.4. Tenoksikama Ait Kalibrasyon Doğrularının Analitik Validasyonu	46
2.1.3.5. Tenoksikamın Çözünme Ortamlarındaki Kısa Süreli Stabilitelerinin İncelenmesi	48
2.1.3.6. Tenoksikamın Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile Analizi	48
2.1.3.7. Tenoksikamın Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile Analizi	49
2.1.3.8. Tenoksikamın Çalışma Ortamlarındaki Çözünürlüğünün Belirlenmesi	49
2.1.3.9. Tenoksikamın Stabilitate Tayini	49
2.2. Önformülasyon Çalışmaları ve Formülasyonların Hazırlanması	50
2.2.1. Kitozan Bazlı Mikropartikül Formülasyonları	50
2.2.2. PLGA Bazlı Mikropartikül Formülasyonları	52
2.2.3. Kitozan Bazlı Termojel Formülasyonları	54
2.3. Mikropartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	57
2.3.1. Mikropartiküllerin Üretim Veriminin Bulunması	57
2.3.2. Mikropartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Bulunması	58
2.3.3. Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Bulunması	58
2.3.4. Mikropartiküllerin Yüzey Yüklerinin Bulunması	59
2.4. Termojel Formülasyonlarının Karakterizasyonu	59
2.4.1. Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin pH Değerinin Ölçülmesi	59
2.4.2. Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin ve Formülasyonların Viskozite Değerlerinin Ölçülmesi	59
2.4.3. Termojel Formülasyonlarının Jelleşme Sürelerinin Bulunması	60
2.4.4. Termojel Formülasyonlarının Enjekte Edilebilirliğinin Belirlenmesi	60
2.5. Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	60
2.6. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetresi (DSC) ile Analizi	61
2.7. Formülasyonların Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile Analizi	61
2.8. Formülasyonlardan Etkin Madde Çıkış Profillerinin İncelenmesi	61
2.9. Formülasyonların Etkin Madde Çıkış Kinetiklerinin İncelenmesi	62

2.10.	Formülasyonların Ön Stabilité İncelemesi	62
2.11.	İstatistiksel Değerlendirme	62
3.	BULGULAR	63
3.1.	Tenoksikamın Özelliklerine Ait Bulgular	63
3.1.1.	Tenoksikamın UV Spektrumu	63
3.1.2.	Tenoksikamın Kalibrasyon Doğrusu	64
3.1.3.	Tenoksikama Ait Kalibrasyon Doğrularının Analitik Validasyonuna Ait Bulgular	66
3.1.4.	Tenoksikamın Çözünme Ortamındaki Kısa Süreli Stabilité İncelemesine Ait Bulgular	69
3.1.5.	Tenoksikamın Diferansiyel Taramalı Kalorimetresi (DSC) ile Analizine Ait Bulgular	72
3.1.6.	Tenoksikamın Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) İle Analizine Ait Bulgular	72
3.1.7.	Tenoksikamın Çalışma Ortamlarındaki Çözünürlüğüne Ait Bulgular	74
3.1.8.	Tenoksikamın Stabilitésine Ait Bulgular	74
3.2.	Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	76
3.2.1.	Mikropartiküllerin Üretim Verimlerine Ait Bulgular	76
3.2.2.	Mikropartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliklerine Ait Bulgular	76
3.2.3.	Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular	78
3.2.4.	Mikropartiküllerin Yüzey Yüklerine Ait Bulgular	78
3.3.	Termojel Formülasyonlarına Ait Bulgular	79
3.3.1.	Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin pH Değerleri	79
3.3.2.	Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin ve Formülasyonların Viskozite Değerleri	79
3.3.3.	Termojel Formülasyonlarının Jelleşme Süreleri	80
3.3.4.	Termojel Formülasyonlarının Enjekte Edilebilirliği	80
3.4.	Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Belirlenen Morfolojik Özelliklerine Ait Bulgular	82
3.5.	Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizine Ait Bulgular	82
3.6.	Formülasyonların Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile Analizine Ait Bulgular	104
3.7.	Formülasyonların Etkin Madde Çıkış Profillerine Ait Bulgular	113
3.8.	Formülasyonların Etkin Madde Çıkış Kinetiklerine Ait Bulgular	121
3.9.	Formülasyonların Ön Stabilité İncelemesine Ait Bulgular	125
4.	TARTIŞMA	128
4.1.	Tenoksikamın Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	128
4.2.	Formülasyonlarının Hazırlanmasına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	131
4.3.	Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	132
4.3.1.	Mikropartiküllerin Verimlerine ve Enkapsülasyon Etkinliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	132
4.3.2.	Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	136
4.3.3.	Mikropartiküllerin Yüzey Yüklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	141

4.4.	Termojel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	144
4.4.1.	Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin pH Değerlerinin Değerlendirilmesi	144
4.4.2.	Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin ve Formülasyonların Viskozite Değerlerinin Değerlendirilmesi	145
4.4.3.	Termojel Formülasyonlarının Jelleşme Sürelerinin ve Enjekte Edilebilirliğinin Değerlendirilmesi	146
4.5.	Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Belirlenen Morfolojik Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	147
4.6.	Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetresi (DSC) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	148
4.7.	Formülasyonların Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometre (FTIR) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	152
4.8.	Formülasyonların Etkin Madde Çıkış Profillerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	154
4.9.	Formülasyonların Ön Stabilite İncelemesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	159
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	163
	ÖZET	167
	SUMMARY	168
	KAYNAKLAR	169
	ÖZGEÇMİŞ	182

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında dünya nüfusunun yaşlanması ile önemi daha da artan ve zamanla yeti kaybına neden olabilen osteoartit hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan steroidal olmayan analjeziklerin, uzun süreli oral yol ile kullanımları sonucu neden olabilecekleri GİS yan etkilerine karşın ilgili eklem içerisine enjeksiyon yöntemiyle uygulanabilen mikropartikül/termojel kombinasyon sistemleri geliştirilmiş ve etkin maddenin eklem içerisinde uzun süreli salımı sağlanarak klinik uygulamalar için gelecek vaat ettiği görülmüştür.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel bilgi birikimi, tecrübesi, yol göstericiliği, açık fikirliliği ve göstermiş olduğu çaba ve hoşgörüsü sebebiyle çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan ve akademi dünyasında çalışma isteğimi teşvik eden çok değerli hocam Doç. Dr. Canan HASÇİÇEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans hayatımdan bu yana Farmasötik Teknoloji alanını sevmemde ve bu alanda gelişmemde katkıları olan anabilim dalı hocalarımız Prof. Dr. Nilüfer TARIMCI, Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR, Prof. Dr. Asuman BOZKIR, Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL, Doç. Dr. Ayşegül KARATAŞ, Doç. Dr. Tansel ÇOMOĞLU, Doç. Dr. Müge KILIÇARLAN, Yrd. Doç. Dr. Tangül ŞEN, Yrd. Doç. Dr. Özge İNAL, Yrd. Doç. Dr. Ogun Mehmet SAKA, Yrd. Doç. Dr. F. Ulya BADILLI, Yrd. Doç. Dr. C. Tuba TÜRK, Yrd. Doç. Dr. Burcu DEVRİM ve Yrd. Doç. Dr. Zerrin SEZGİN BAYINDIR' a çok teşekkür ederim.

Araştırma görevlisi olarak göreve başladığım ilk günden bu yana, yüksek lisans eğitimimi tamamlamam için bana her türlü desteği ve yardımı eksik etmeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Nurettin YAYLI, Dekan Yardımcıları Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Sermet YILDIRMIŞ hocalarım ile Fakülte Sekreteri Nurten KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında üretim ve analiz basamaklarında laboratuvar imkanlarını kullanmama fırsat veren Prof. Dr. Asuman BOZKIR ve Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim. Çalışma kapsamında hazırladığımız formülasyonların FTIR analizlerinin yapılmasında yardımcı olan fakültemiz Farmasötik Kimya Anabilim Dalı hocalarımızdan Prof. Dr. Hakan GÖKER ve Doç. Dr. Mehmet ALP' e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca SEM analizlerinin yapılması için fakülte imkanlarını esirgemeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metarülji ve Malzeme Bölümü hocalarından Doç. Dr. Hamidullah ÇUVALCI ve ölçümlerin yapılmasında yardımcı olan Uzm. Fatih ÖZKAYACI' ya teşekkür ederim. Son olarak tez çalışmamda kullandığım etkin maddenin sağlanmasında yardımcı olan Drog-san İlaçları San. ve Tic. A. Ş. firmasına teşekkür ederim.

Çalışmamın deneysel basamağında ve sonrasında bilgisiyle bana ışık tutan, her türlü soruma cevap veren ve deneysel çalışmalarında bana yardımcı olan çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. C. Tuba TÜRK' e çok teşekkür ederim. Ayrıca yaptığım deneysel çalışmalarında bana yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Özge İNAL, Yrd. Doç. Dr. Oğun Mehmet SAKA, Yrd. Doç. Dr. Burcu DEVRİM, Uzm. Ecz. Umut Can ÖZ ve Ecz. Özge GÜN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı bünyesinde çalışan ve hem çalışma hem de sosyal yaşantımda beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım Dr. Ecz. Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN, Dr. Ecz. Gülin AMASYA, Dr. Ecz. Aslihan H. ATILGAN, Ecz. Tuğba EREN, Ecz. Miray GÖRGÖZ, Ecz. Fatih TURHAN, Ecz. Ahmet Doğan ERGİN, Uzm. Ecz. Umut Can Öz, Ecz. Özge GÜN ve Ecz. Sema SARISOY ile çok sevgili oda arkadaşım Ecz. Özge ERKAN' a çok teşekkür ederim.

Eğitim-öğretim dönemi içerisinde Trabzon şehrinde çok kısıtlı zaman geçirmeme rağmen orada aile sıcaklığını hissetmeme neden olarak beni hiç yalnız bırakmayan, ayrıca çalışma hayatımda da desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Sıla Özlem ŞENER, Arş. Gör. Merve BADEM, Arş. Gör. Nuriye KORKMAZ, Arş. Gör. Nevin ULAŞ, Arş. Gör. Seçkin ENGİN, Arş. Gör. H. Erdi SELLİTEPE, Arş. Gör. Elif Nur GAZİOĞLU, Arş. Gör. Nurdan YAZICI, Arş. Gör. Serhat SEVGİ, Arş. Gör. Sercan YILDIRIM, Arş. Gör. Büşra YAYLI, Arş. Gör. Burak BARUT, Arş. Gör. Şeyda AKKAYA, Arş. Gör. Gökçe ÖZTÜRK ve Arş. Gör. Rengin REİS' e tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Hayatıma adım attığım ilk andan itibaren sevgileri ile beni kucaklayan ve hayatımın her döneminde desteklerini esirgemeyen, iyi bir eğitim almam için ellerinden gelen her türlü fedakarlığı yapan annem Özden SUNAR'a ve babam Sezayi SUNAR' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Topluma faydalı bir birey olmam için mesleki etik anlayışını içimize yerleştirmeye çalışan ve kendimizi geliştirmemiz için her daim bizi teşvik eden ve benim için bir idol olan çok değerli dedem Mustafa KÖKCAN' a ve anneannem Öznur KÖKCAN' a teşekkürlerimi sunarım. Bir kardeş olarak desteğini ve yardımını her daim yanımda hissettiğim, benim için türlü fedakarlıklar yapan canım kardeşim Esat Mustafa SUNAR'a teşekkür ederim.

Küçüklüğümden bu yana benim için bir kız kardeşten daha öte olan, kendi tecrübeleri ile beni aydınlatan, her daim yol göstericim olan Ayşe Saliha SUNAR YETGİN' e çok teşekkür ederim. Ayrıca, akademik alanda sahip olduğu bilgi ve tecrübeleri ile tez çalışmama sağladığı katkılarından dolayı eniştem Dr. Halil YETGİN' e çok teşekkür ederim.

Varlıkları ile hayatımın her alanında beni mutlu eden, mesleki ve kişisel gelişiminde katkıları yadsınamaz bir gerçek olan çok sevgili arkadaşlarım Hatice Nur ÇELİK ve Muhammed Cihat ÇELİK çifti ile Mualla TOPAL' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bürde Süheyla SUNAR
Temmuz 2016, ANKARA

SİMGELER VE KISALTMALAR

λ_{max}	Maksimum Absorbansın Olduğu Dalgaboyu
% EE	Enkapsülasyon Etkinliği
% LC	Yükleme Kapasitesi
ANOVA	Varyans Analizi
ASP	Amonyum sodyum fosfat dibazik tetrahidrat
COX	Siklooksijenaz Enzimi
CSPC	Kıkırdak Kök ve Öncül Hücreleri
CTAB	Hegzadesiltrimetilamonyum Bromür
DCM	Diklorometan
DMOAD	Hastalık Modifiye Edici Osteoartrit İlaçları
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
GİS	Gastro-İntestinal Sistem
HLA	İnsan lökosit antijeni
HMW	Yüksek Molekül Ağırlıklı
İA	İntraartiküler
IL-1	İnterlökin-1
k	Kinetik Denklem Sabiti
LMW	Düşük Molekül Ağırlıklı
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
LPS	Lipopolisakkaritler
MMW	Orta Molekül Ağırlıklı
n	Korsmeyer-Peppas Kinetiğine Ait Üssel İfade
NSAİİ	Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar
OA	Osteoartrit
PALS	Phase Analysis Light Scattering

PCLA-PEG-PCLA	poli(ϵ -kaprolakton-ko-laktik)-b-poli(etilen glikol) -b-poli(ϵ -kaprolakton-ko-laktik)
PLLA	Poli(L-laktik) Asit
PBS	Fosfat Tampon Tuzu
PG	Prostaglandin
pKa	Asitlik Sabiti
PLGA	Polilaktik-ko-Glikolik Asit
PLLA	Poli-L-laktik Asit
PPI	Proton Pompası inhibitörü
PVA	Polivinil Alkol
r^2	Determinasyon Katsayısı
RSD	Yüzde Bağlı Hata
RSM	Artan Ortalama Kare
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	Standat Hata
SS	Standart Sapma
Tg	Camsı Geçiş Sıcaklığı
TNX	Tenoksikam
TPP	Sodyum Tripolifosfat
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
YLD	Yeti Kaybı İle Geçirilen Yıl

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Osteoartrit tedavi maliyeti (Chen ve ark., 2012a)	6
Şekil 1.2.	Eklem yapısı (Gerwin ve ark., 2006)	12
Şekil 1.3.	Kıkırdak doku (Jiang ve Tuan, 2015)	15
Şekil 1.4.	Sağlıklı ve osteoartrit gelişen eklem yapısı (http://www.bouncepodiatry.com.au/conditions/leg/osteoarthritis-knee/)	16
Şekil 1.5.	NSAİİ'lerin COX enzimlerini inhibisyonu (Rao ve Knaus, 2008; Williams ve ark., 1999)	19
Şekil 1.6.	Tenoksikamın moleküler yapısı (Sweetman, 2009)	27
Şekil 1.7.	Selüloz, kitin ve kitozanın moleküler yapıları (Kumar, 2000)	31
Şekil 1.8.	Kitin ve kitozanın üretim prosesi (Dutta ve ark., 2004; Kumar, 2000; Rinaudo, 2006)	32
Şekil 1.9.	İyonik jelasyon yönteminin şematik hali	34
Şekil 1.10.	Çapraz bağlı kitozan (Agnihotri ve ark., 2004)	35
Şekil 1.11.	Kitozanın jelleşme mekanizması (Ruel-Gariepy ve Leroux, 2004; Supper ve ark., 2013)	38
Şekil 1.12.	PLGA sentezi (Pan ve Ding, 2012)	39
Şekil 2.1.	İyonik jelasyon yöntemi ile kitozan mikropartiküllerin üretim diyagramı	51
Şekil 2.2.	Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile PLGA mikropartiküllerin üretim diyagramı	53
Şekil 2.3.	Kitozan termojel üretim diyagramı	56
Şekil 2.4.	Kitozan termojelinin farklı sıcaklık derecelerindeki sol-jel geçişi	57
Şekil 3.1.	Tenoksikamın PBS 7,4 ortamındaki UV spektrumu	63
Şekil 3.2.	Tenoksikamın DCM ortamındaki UV spektrumu	64
Şekil 3.3.	Tenoksikamın PBS 7,4 ortamındaki kalibrasyon denklemi	65
Şekil 3.4.	Tenoksikamın DCM ortamındaki kalibrasyon denklemi	65
Şekil 3.5.	Tenoksikamın PBS 7,4 ve DCM ortamlarına ait % 95 güven sınırlarındaki kalibrasyon doğruları	66
Şekil 3.6.	Tenoksikama ait DSC termogramı	73

Şekil 3.7.	Tenoksikama ait FTIR spektrumu	73
Şekil 3.8.	+4 °C buzdolabındaki stabilitesi	74
Şekil 3.9.	+25 °C % 60 bağıl nem ve karanlık ortamdaki stabilitesi	75
Şekil 3.10.	+25 °C % 60 bağıl nem ve aydınlık ortamdaki stabilitesi	75
Şekil 3.11.	+40 °C %70 bağıl nem ve karanlık ortamdaki stabilitesi	76
Şekil 3.12.	CH3 ve CH8 formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	83
Şekil 3.13.	P2 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	84
Şekil 3.14.	P5 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	85
Şekil 3.15.	P6 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	86
Şekil 3.16.	P11 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	87
Şekil 3.17.	P13 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	88
Şekil 3.18.	T3 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	89
Şekil 3.19.	T4 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	90
Şekil 3.20.	T5 formülasyonuna ait SEM görüntüleri	91
Şekil 3.21.	T4-P13 kombinasyon formülasyonuna ait SEM görüntüleri	92
Şekil 3.22.	T5-P13 kombinasyon formülasyonuna ait SEM görüntüleri	93
Şekil 3.23.	Kitozan(MMW)’a ait DSC termogramı	94
Şekil 3.24.	TPP’e ait DSC termogramı	94
Şekil 3.25.	PLGA (50:50)’e ait DSC termogramı	95
Şekil 3.26.	PLGA (75:25)’e ait DSC termogramı	95
Şekil 3.27.	PVA’a ait DSC termogramı	96
Şekil 3.28.	CTAB’a ait DSC termogramı	96
Şekil 3.29.	ASP’e ait DSC termogramı	97
Şekil 3.30.	TNX, kitozan ve TPP fiziksel karışımına ait DSC termogramı	97
Şekil 3.31.	Kitozan ve ASP fiziksel karışımına ait DSC termogramı	98
Şekil 3.32.	TNX, PLGA(50:50) ve PVA fiziksel karışımına ait DSC termogramı	98
Şekil 3.33.	TNX, PLGA(50:50) ve CTAB fiziksel karışımına ait DSC termogramı	99
Şekil 3.34.	TNX, PLGA(75:25) ve CTAB fiziksel karışımına ait DSC termogramı	99
Şekil 3.35.	Farklı TPP konsantrasyonlarına sahip CH8(% 1), CH3(% 0,75), CH9(%0,5) ve C10(% 0,25) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları	100
Şekil 3.36.	Farklı kitozan konsantrasyonlarına sahip CH3(% 0,2), CH11(% 0,3) ve CH12(% 0,4) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları	100
Şekil 3.37.	P1 Formülasyonuna ait DSC termogramı	101
Şekil 3.38.	Farklı PLGA konsantrasyonlarına sahip P4(% 1), P5(% 2) ve P6(% 3) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları	101

Şekil 3.39. Farklı CTAB konsantrasyonlarına sahip P7(% 0,5), P8(% 1) ve P9(% 1,5) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları	102
Şekil 3.40. Farklı PLGA türlerine sahip P8(PLGA 50:50) ve P11(PLGA 75:25) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları	102
Şekil 3.41. Farklı ASP konsantrasyonlarına sahip T3(% 60), T4(% 45) ve T5(% 30) kodlu termojel formülasyonlarına ait DSC termogramları	103
Şekil 3.42. Mikropartikül/Termojel kombinasyon formülasyonlarına (T4(% 45)-P13 ve T5(% 30)-P13) ait DSC termogramları	103
Şekil 3.43. Kitozan (MMW)'a ait FTIR spektrumu	104
Şekil 3.44. TPP'ye ait FTIR spektrumu	104
Şekil 3.45. PLGA(50:50)'ye ait FTIR spektrumu	105
Şekil 3.46. PLGA(75:25)'ye ait FTIR spektrumu	105
Şekil 3.47. PVA'ya ait FTIR spektrumu	105
Şekil 3.48. CTAB'a ait FTIR spektrumu	106
Şekil 3.49. ASP'e ait FTIR spektrumu	106
Şekil 3.50. Farklı TPP konsantrasyonlarına sahip kitozan mikropartiküllerin FTIR spektrumları	107
Şekil 3.51. Farklı kitozan konsantrasyonlarına sahip kitozan mikropartiküllerin FTIR spektrumları	108
Şekil 3.52. Farklı PLGA bileşimine sahip mikropartiküllerin FTIR spektrumları	109
Şekil 3.53. Farklı PLGA konsantrasyonlarına sahip mikropartiküllerin FTIR spektrumları	110
Şekil 3.54. Farklı CTAB konsantrasyonlarına sahip mikropartiküllerin FTIR spektrumları	111
Şekil 3.55. T3 Formülasyonuna ait FTIR spektrumu	112
Şekil 3.56. T4 Formülasyonuna ait FTIR spektrumu	112
Şekil 3.57. T5 Formülasyonuna ait FTIR spektrumu	112
Şekil 3.58. T4-P13 kombinasyon formülasyonuna ait FTIR spektrumu	113
Şekil 3.59. T5-P13 kombinasyon formülasyonuna ait FTIR spektrumu	113
Şekil 3.60. Tenoksikamın PBS 7,4 ortamındaki çözünme hızı grafiği	114
Şekil 3.61. Farklı pH ortamlarında üretilmiş kitozan bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği	114
Şekil 3.62. Farklı TPP konsantrasyonlarına sahip kitozan bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği	115
Şekil 3.63. Farklı kitozan konsantrasyonlarına sahip kitozan bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği	115

Şekil 3.64. Farklı karıştırma hızlarına sahip kitozan bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği	116
Şekil 3.65. Farklı PVA konsantrasyonlarına sahip PLGA bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği	116
Şekil 3.66. Farklı PLGA konsantrasyonlarına sahip PLGA bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği	117
Şekil 3.67. Farklı CTAB konsantrasyonlarına sahip PLGA (50:50) bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği	118
Şekil 3.68. Farklı CTAB konsantrasyonlarına sahip PLGA (75:25) bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği	119
Şekil 3.69. T4-TNX karışımı ve T4-CH3 kombinasyon formülasyonundan TNX çıkış grafiği	120
Şekil 3.70. T4-P6, T4-P8 ve T4-P11 kombinasyon formülasyonlarından TNX çıkış grafiği	121

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Osteoartrit kaynaklı giderler (Chen ve ark., 2012a)	5
Çizelge 1.2.	Osteoartrit görülen ve sağlıklı bireylerdeki sinovyal sıvı ve plazma bileşimleri (Gerwin ve ark., 2006)	14
Çizelge 1.3.	Piyasada yer alan intraartiküler kullanılan preparat örnekleri (Üstünes, 2016)	20
Çizelge 1.4.	Eklem içine uygulanan ilaç modifiye salım sistem örnekleri	22
Çizelge 1.5.	Tenoksikamın piyasada yer alan müstahzarları (Üstünes, 2016)	29
Çizelge 2.1.	Kitozan mikropartikül formülasyonları	52
Çizelge 2.2.	PLGA mikropartikül formülasyonları	54
Çizelge 2.3.	Kitozan termojel formülasyonları	55
Çizelge 3.1.	Tenoksikamın farklı ortamlardaki kalibrasyon denklemlerine ait verileri	64
Çizelge 3.2.	Tenoksikamın PBS 7,4 ve DCM ortamlarındaki kalibrasyon doğrusuna ait parametreler	67
Çizelge 3.3.	Tenoksikamın PBS 7,4 tamponu ve DCM ortamlarındaki doğruluk ve geri elde değerleri	67
Çizelge 3.4.	PBS 7,4 için tekrarlanabilirlik verileri	68
Çizelge 3.5.	DCM için tekrarlanabilirlik verileri	68
Çizelge 3.8.	Tenoksikamın farklı ortamlara ait teşhis ve tayin sınırları	69
Çizelge 3.6.	Tenoksikamın PBS 7,4 tamponundaki ara kesinlik incelemesine ait bulguları	70
Çizelge 3.7.	Tenoksikamın DCM içindeki ara kesinlik incelemesine ait bulguları	71
Çizelge 3.9.	Tenoksikamın PBS 7,4 tamponundaki kısa süreli stabilite incelemesine ait bulgular	72
Çizelge 3.10.	Tenoksikamın farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri	74
Çizelge 3.11.	Mikropartikül formülasyonlarına ait üretim verim değerleri	77
Çizelge 3.12.	Mikropartikül formülasyonlarına ait enkapsülasyon etkinliği değerleri	77
Çizelge 3.13.	Mikropartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri ve dağılımına ait bulgular	78

Çizelge 3.14. Kitozan ve PLGA bazlı mikropartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri	79
Çizelge 3.15. Çözelti pH değerleri	80
Çizelge 3.16. Kitozan çözeltilerinin ve formülasyonların viskozite değerleri	81
Çizelge 3.17. Termojel formülasyonlarının jelleşme süreleri	81
Çizelge 3.18. Termojel formülasyonlarına ait enjektörden çıkış süreleri	81
Çizelge 3.19. Kitozan mikropartikül formülasyonlarına ait kinetik bulguları	122
Çizelge 3.20. PLGA mikropartikül formülasyonlarına ait kinetik bulguları	123
Çizelge 3.21. Mikropartikül/Termojel kombinasyon formülasyonlarına ait kinetik bulgular	124
Çizelge 3.22. Mikropartikül formülasyonlarının ön stabilite incelemelerine ait zeta potansiyeli değerlerine ait bulgular	126
Çizelge 3.23. Mikropartikül formülasyonlarının ön stabilite incelemelerine ait partikül büyüklüğü ve dağılımlarına ait bulgular	127

1. GİRİŞ

Osteoartrit (OA); kıkırdak, kemik ve sinovyal dokularda çeşitli travmatik, biyomekanik, inflamatuvar ve genetik faktörlerin etkisiyle meydana gelen, kıkırdak yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulmasıyla birlikte ortaya çıkan ve sinovyal eklemlerde görülen kıkırdak dejenerasyonu, osteofit oluşumu ve subkondral skleroz ile karakterize kronik dejeneratif bir hastalıktır (Mankin, 1993; Aydın 1997). Ayrıca bu hastalık genellikle sinsi başlangıçlı olup yavaş bir hastalık seyri göstermektedir. Klinikte ise; kademeli bir ağrı gelişimi, eklem katılığı ve sınırlı eklem hareketleri ile karakterizedir. Osteoartrit gelişimini eklem yaralanmaları ve deformasyonları, obezite, mesleki ve mesleki olmayan fiziksel aktiviteler gibi biyomedikal faktörler ile yaş, genetik yapı, östrojen eksikliği, cinsiyet, düşük kemik mineral yoğunluğu, etnik köken, eklem sıvısında kristal varlığı gibi sistemik faktörler önemli derecede etkilemektedir. Osteoartrit görülme sıklığı yaş ile birlikte artmakta ve günümüzde yaşam süresinin artmasıyla birlikte büyük önem kazanmaktadır (Arden ve Nevitt, 2006; Felson ve Lawrence, 2000; Puig-Junoy ve Zamora, 2015). Dünyanın çeşitli bölgelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda 50 yaş üzeri kişilerin % 30' unda, 65 yaş üzeri kişilerin % 80' inde semptomatik osteoartritin görüldüğü bildirilmiştir (Felson ve Lawrence, 2000).

Osteoartrit tedavi yaklaşımının ana prensibi; hastanın ağrılarını kontrol etmek, eklem fonksiyon yetersizliklerini gidermeye çalışmak ve hastanın yaşam kalitesini yükseltmektir. Bu amaçla hayat tarzının değiştirilmesi, termal tedaviler, akupunktur, uygun egzersizlerin yapılması gibi nonfarmakolojik yaklaşımlar ile farmakolojik tedavi seçenekleri bir arada kullanılmaktadır. Medikal tedavi genellikle çeşitli uluslararası örgütlerin geliştirdiği rehberlere göre yürütülmektedir. Bu amaçla analjezikler, Steroidal olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), fizik tedavi ajanları ve intraartiküler (İA) enjeksiyonlar (hyaluronik asit, glukokortikoidler, radyoaktif maddeler) gibi farmakolojik tedaviler ile bu tedavilerin yeterli gelmemesi durumunda ise çeşitli cerrahi girişimler uygulanmaktadır (Butoescu ve ark., 2009; Pradal ve ark., 2012).

Osteoartrit tedavisinde bugüne kadar ağırlıklı olarak NSAİİ' lerin sistemik kullanımı üzerinde durulmuştur. Ancak tedavi amacıyla kullanılan NSAİİ' lerin uzun süreli kullanımları sonucu istenmeyen gastrointestinal sistem (GİS) ve renal sistem üzerine yan etkileri görülebilmektedir. Kronik hastalıkların doğası gereği bir ilacın uzun süreli sistemik olarak kullanılabilmesi için minimum yan etkiye sebep olmalıdır. Bazı NSAİİ' ler GİS ve renal sistem üzerindeki yan etkilerine ilaveten insan ve hayvan kıkırdak dokusunda kondrosit biyosentezini azaltmakta ve kıkırdak yıkımına neden olmaktadır. Bunun aksine oksikam grubundan bir NSAİİ olan tenoksikamın yapılan in vitro çalışmalarda kıkırdak dokusuna faydalı olabileceği ve kıkırdaktan ziyade sinoviyumda biriktiği gösterilmiş ve yine yapılan başka bir çalışmada tenoksikamın kondroprotektif etkili olduğu ve proteoglikanaz ve kollogenaz enzimlerini inhibe ederek kıkırdak yıkımını azaltması sonucu kıkırdak dejenerasyonunun ilerlemesini yavaşlattığı görülmüştür (Vignon ve ark. 1991; Cook ve ark., 1997).

Osteoartrit tedavisinde kullanılan piyasadaki çoğu ilaç oral yol ile kullanılan hızlı salım tablet ya da kapsül şeklindedir. Ancak mevcut olan ya da kullanıma aday olabilecek çoğu ilaç terapötik açıdan etkili olmasına rağmen düşük biyoyararlanım göstermektedir. Oral yol ile kullanım klinik toksisite açısından da önem arz etmektedir. Oral uygulanan etkin maddelerin gerekli terapötik doza ulaşmaları için yüksek dozda kullanım gerekliliğinden dolayı sıklıkla toksisite görülmektedir (Butoescu ve ark., 2009; Gerwin ve ark., 2006). Artrit tedavisi için kullanılan NSAİİ' lerin özellikle GİS üzerinde ülser ve gastrit gibi istenmeyen etkileri bulunmaktadır. Örneğin tenoksikam kullanan hastaların % 11,4' ünde GİS rahatsızlıkları görülmüştür (Sweetman, 2009). NSAİİ' lerin bu olası yan etkileri kronik hastalıklarda kullanımını güçleştirmekte ve bu yan etkilerini azaltacak yeni uygulama arayışlarını doğurmaktadır.

Artritin lokal olarak gelişmesi, ilacın doğrudan inflamasyonun olduğu ekleme yan etkilerin minimize edilerek intraartiküler (İA) yolla uygulanmasına fırsat verir. Ayrıca artritin oldukça sık görüldüğü diz, kol ve ayak eklemleri IA uygulama için oldukça elverişlidir. Buna ek olarak, IA olarak yapılan plasebo uygulamalarında % 36-86 arasında değişen olumlu sonuçlar alınmış olması eklem içi uygulamalarını daha cazip hale getirmiştir (Felson ve Lawrence, 2000).

Osteoartrit tedavisinde IA uygulamaların sahip oldukları avantaj yanında kullanımlarını sınırlayan durumlar da mevcuttur. Etkin maddenin fizikokimyasal

yapısına bağı olarak eklem kavitesinden hızlıca uzaklaştırılması bunlardan bir tanesidir. Ayrıca inflamasyon görülen eklemde permeabilitede artışın gerçekleşmesiyle etkin madde molekülleri daha hızlı bir şekilde kaviteden uzaklaşmaktadır. Genel olarak NSAİİ' lerin eklem içerisinde kalış süreleri 1 ile 5 saat arasında değişmekte, molekül yapısına bağı olarak bu süre uzayabilmektedir. Ancak NSAİİ' lerin eklem içerisine uygulanmasının klinik açıdan bir önem taşıyabilmesi için enjeksiyon sıklığının en az birkaç haftada bir ve hatta ayda bir olması gerekmektedir. Etkin madde moleküllerini bu süre zarfında eklem içerisinde tutabilmek için ise nanopartiküller, mikropartiküller, lipozomlar ve termal hidrojeller (termojel) gibi modifiye salım sistemleri ön plana çıkmaktadır (Cook ve ark., 1997; Felson ve Lawrence, 2000).

İlaç taşıyıcı sistemlerin eklem içerisine uygulanabilmeleri için; etkin madde salım süresini uzatmalı, modifiye salım sisteminin eklem içerisinde kalış süresini artırmalı ve enjeksiyon sonrası sinovyal kavitede inflamasyon oluşumuna neden olmamalıdır. Bu nedenle eklem içerisine enjekte edilecek partiküler sistemlerin küresel yapıda, pürüzsüz yüzey özelliklerine sahip, pozitif yüzey yüklü ve 5-15 μm partikül büyüklüğünde olmaları istenmektedir (Butoescu ve ark., 2009; Edwards, 2011; Gerwin ve ark., 2006; Kim ve ark., 2015). Eklem içerisine uygulanacak partiküler sistemlerin sahip olması istenen fizikokimyasal özelliklere ilave olarak, modifiye salım sisteminin eklem içerisinde lokalize olarak kalmasını sağlamak amacıyla partiküllerin termojel sistemleri ile kombine halde İA uygulanması akılcı bir seçenek olmaktadır (Butoescu ve ark., 2009; Kim ve ark., 2015; Pradal ve ark., 2012).

Yukarıda bahsedilen bilgilerin ışığında, tez çalışmamız kapsamında osteoartrit tedavisinde oral yolla kullanılan bir NSAİİ olan tenoksikamın GİS üzerindeki yan etkilerini azaltmak amacıyla eklem içerisine enjeksiyon yoluyla verilmesine olanak sağlayacak modifiye salım sistemlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda tenoksikamın eklem içinde salım süresini uzatacak, uzun süreli lokalizasyonu sağlayacak ve enjeksiyon sonrasında inflamasyon oluşturmayacak fizikokimyasal özelliklere sahip kitozan ve PLGA mikropartikül formülasyonları geliştirilmeye çalışılmıştır. Hazırlanacak mikropartiküllere arzu edilen fizikokimyasal özellikleri kazandırmak için partiküllere pozitif yüzey yükü kazandıracak ve partikül boyutunun 5-15 μm sınırları içerisinde olmasını sağlayacak yöntemler üzerinde durulmuştur. Ayrıca, mikropartikül formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerinin modifiye edilmesine ek olarak, eklem içerisinde uzun süreli lokalizasyonun sağlanması için

mikropartiküllerin kombine halde verileceği vücut sıcaklığında jelleşebilen kitozan termojel formülasyonları geliştirilmiştir. Son basamakta ise; eklem içinde salım süresini uzatacak, uzun süreli lokalizasyonu sağlayacak ve enjeksiyon sonrasında inflamasyon oluşturmayacak fizikokimyasal özelliklere sahip mikropartikül/termojel formülasyonlarının in vitro analizleri yapılarak İA uygulama için ön değerlendirmeleri yapılmıştır.

1.1. Osteoartrit ve Epidemiyolojisi

İskelet kas sistemine ait hastalıklar, uzun süreli ve şiddetli ağrı ile hareket kısıtlılığına neden olan en yaygın hastalıklardandır. Birleşmiş Milletler ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO), kas iskelet sistemi rahatsızlıklarının artan önemi nedeniyle 37 ülkede artrit gibi kas iskelet sistemi rahatsızlıklarının yükünün belirlenmesi için harekete geçmiştir. 2000 - 2010 yılları "*Bone and Joint Decade*" olarak ilan edilmiş ve bu hastalıkların nedenlerinin anlaşılması, yapılacak tedaviler, alınacak önlemler, eğitim ve gerekli araştırmaların yapılması hedeflenmiştir (Chen ve ark., 2012a).

En sık görülen kronik iskelet kas sistemi hastalıklarından olan osteoartrit, görülme sıklığı yaş ile artmasına rağmen popülasyonun büyük bir kısmını etkileyen bir dejeneratif eklem rahatsızlığıdır. Osteoartrit görülen hasta sayısı; obezite, yaşlanan nüfus ve azalan fiziksel aktivite sebebiyle gittikçe artmaktadır (Puig-Junoy ve Zamora, 2015). Genellikle diz eklemi etkilenmekte olup araştırmalara göre radyografik muayene yapılan 50 yaş üstü insanların % 30' unda osteoartrite rastlanılmıştır ve bu oran 65 yaş üstünde % 80'e çıkmaktadır. 2005 yılı verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 100.000 insan, yatağından banyosuna diz eklemlerindeki osteoartrit ağrısı sebebiyle rahatça gidememektedir. Osteoartrit, yaygın görülen ve sıklıkla hareket kısıtlılığına yol açan bir rahatsızlık olduğu için diğer hastalıklara göre yürüme ve merdiven çıkma gibi faaliyetlerde hastayı daha fazla engellemektedir (Felson ve Lawrence, 2000; Neustadt, 2006).

2004 yılı WHO verilerine bakıldığında dünya genelinde yaklaşık 151 milyon insanın osteoartrit hastası olduğu ve bu hastaların % 10'u Afrika, % 22'si Amerika, % 6'sı Doğu Akdeniz, % 40' ı Avrupa , %27,5'u Güneydoğu Asya ve % 45' inin Batı Pasifik bölgelerinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yüksek gelirli ülkelerde 0-59 yaş arasında 1,9 milyon ve 60 yaş üstünde 8,1 milyon, orta ve düşük gelirli ülkelerde 0-59

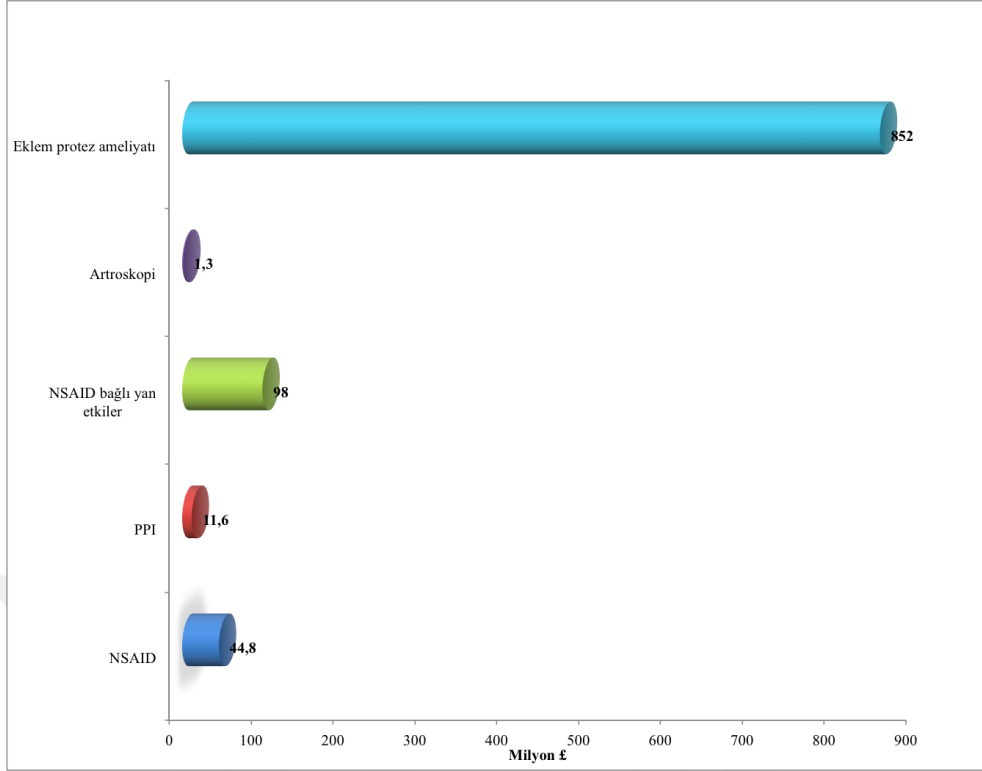
yaş arasında 14,1 milyon ve 60 yaş üstünde 19,4 milyon olmak üzere toplam 43,4 milyon hastada hareket kısıtlılığı olduğu saptanmıştır. Hastalıkların neden olduğu yeti kaybı ile geçirilen yıl (YLD) verileri göz önüne alındığında, dünya genelinde kadınlarda osteoartrit beşinci sırada iken, erkeklerde ise ilk onda yer almaktadır. Yüksek gelirli ülkelerde osteoartrit, YLD sıralamasında 5. sırada yer alırken düşük ve orta gelirli ülkelerde dokuzuncu sırada yer almaktadır (Mathers ve ark., 2008) . Türkiye’de 2004 verileri ile hazırlanan raporda, hastalık yükü sıralamasında osteoartrit erkeklerde sekizinci sırada, kadınlarda yedinci sırada yer almaktadır. YLD sıralamasına bakıldığında ise erkeklerde birinci sırada yer alırken kadınlarda unipolar depresif bozukluklar ve demir eksikliği anemisinin ardından 3. sırada yer almaktadır (Ünüvar ve ark., 2004).

Çizelge 1.1. Osteoartrit kaynaklı giderler (Chen ve ark., 2012a)

Direkt maliyetler	İndirekt maliyetler	Manevi kayıplar
Cerrahi operasyonlar	Üreticilikte azalma	Ağrı ve sıkıntı çekme
Hastane kaynakları	İşe devam edememe	Hayat kalitesinde azalma
Farmakolojik/ nonfarmakolojik tedavi	Erken ölüm	Depresyona girme riski
Tedavi kaynaklı yan etkiler	Maluliyet maaşı	Anksiyete
Ar-Ge		

Osteoartrit sık rastlanan bir hastalık olduğu ve zamanla yeti kaybına neden olduğu için çeşitli mali yüklerle neden olmaktadır. Bu mali yükleri Çizelge 1.1’ de görüldüğü gibi direkt ve indirekt olarak sınıflandırabiliriz. Direkt maliyeti farmakolojik/nonfarmakolojik tedavi, cerrahi operasyon, hastane kaynaklarının kullanımı ve osteoartrit tedavisinden kaynaklanan komplikasyonlar oluşturmaktadır. İndirekt maliyeti ise; iş hayatındaki zaman kaybı, ağrı sebebiyle üreticilikteki azalma, bakım zamanı, erken mortalite ve hareket kısıtlılığından kaynaklanan maddi yardımlar oluşturmaktadır. Manevi kayıpları kapsayan üçüncü bir kategori daha oluşturursak, hastaların rahatsızlıklarından dolayı çektikleri sıkıntı ve ağrı nedeniyle hayat kalitelerinde azalmayı ekleyebiliriz (Chen ve ark., 2012a).

Osteoartrit tedavisi uygulanan hastalara NSAİİ grubu ilaçlar topikal ve oral olarak yaygın bir şekilde reçete edilmektedir. Ancak bu ilaçların neden olduğu yan etkileri



Şekil 1.1. Osteoartrit tedavi maliyeti (Chen ve ark., 2012a)

gidermek için proton pompası inhibitörleri (PPI) gibi ek ilaç yazımı da gerçekleştirilmektedir. İngiltere için yapılmış bir çalışmada Şekil 1.1’ de görüldüğü gibi tedavi için gerekli olan etkin madde grubundan ziyade tedavinin neden olduğu yan etkileri gidermek daha maliyetli olmaktadır. Ayrıca NSAİİ tedavisinin yeterli gelmeyip artroskopi ve cerrahi girişimlerin uygulanması maliyeti önemli derecede artırmaktadır (Chen ve ark., 2012a). Yapılan bu çalışmalar göstermektedir ki osteoartrit tedavisinin etkin bir şekilde yapılabilmesi için ilaç kaynaklı yan etkiler minimuma indirilmelidir.

1.2. Osteoartrit Risk Faktörleri

Osteoartritin asıl nedeni henüz bilinmemesine rağmen hastalığın görülmesinde ve ilerlemesinde çeşitli risk faktörleri vardır. Bu risk faktörlerini sistemik faktörler ve lokal biyomekanik faktörler şeklinde sınıflandırabiliriz.

1.2.1. Sistemik Risk Faktörleri

1.2.1.1. Etnik Köken

Etnik kökenin diz ve kalça osteoartriti üzerine etkisi Afrikan- Amerikan ve beyaz bireyler ele alınarak incelendiğinde çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada Afrikan-Amerikan kadınlarda osteoartrit yüksek oranda görülmesine rağmen başka bir çalışmada fark gözlenmemiştir. Afrikan-Amerikan erkeklerde beyaz bireylere oranla % 35 daha fazla sıklıkla osteoartrit geliştiği görülmüştür. Ayrıca osteoartrit görülen Afrikan-Amerikan popülasyonunda hareket kabiliyet kaybı ve bilateral tutulum daha sıklıkla görülmüştür (Felson ve Lawrence, 2000). Birleşik Devletlerde yapılmış bir çalışmada Çinli ve beyaz bireyler karşılaştırıldığında erkeklerde aynı sıklıkla hastalığın görüldüğü ancak Çinli kadınlarda daha sık osteoartrit görüldüğü saptanmıştır. Çinli popülasyonda obezitenin az olmasına rağmen, popülasyonun % 50' sinde el bölgesinde osteoartrit gelişirken % 10 oranında da kalça osteoartriti görülmektedir. Bu oranların yüksekliği ise Çinli bireylerin çömelme hareketlerinden dolayı eklemlere fazla yük binmesiyle açıklanmaktadır (Arden ve Nevitt, 2006).

Bazı ırklar arasında osteoartrit görülme sıklığında çeşitli farklılıklar gözlenirse de biyolojik, hayat standardı ve sosyoekonomik faktörlerin etkileri tam olarak bilinmemektedir. Etnik köken farklılığına bağlı olarak bireylerin vücut kütle indekslerinin ya da biyomarkerlar gibi faktörlerin değişmesi osteoartrit görülme sıklığı üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Felson ve Lawrence, 2000).

1.2.1.2. Hormonal Durum ve Kemik Dansitesi

Östrojen, kadınlarda ve erkeklerde kemik homeostazının sağlanmasında etkili olan bir medyatördür. Aynı zamanda östrojen; kondrisit aktivitesi, nitrit oksit ve reaktif oksijen türlerinin oluşması, kıkırdak dokuda anabolizma ve katabolizma olayları gibi bir çok metabolizma reaksiyonunda da rol almaktadır (Riancho ve ark., 2010). Ayrıca menopoza girdikten sonra osteoartritin kadınlarda görülme oranının yükselmesi, östrojen eksikliğinin artrit oluşmasında etkili olduğunu düşündürmektedir (Felson ve Lawrence, 2000). Yapılan çalışmalar bu hipotezi doğrular niteliktedir. Çalışmalara

bakıldığında östrojen ya da türevlerinin yetersizliği ile osteoartrit gelişimi ve görülme sıklığı arasında pozitif bir ilişki olduğu görülmüştür (Hart ve ark., 1999; Sandmark ve ark., 1999; Sowers ve ark., 2006).

Osteoartrit ve osteoporoz arasındaki ilişkiye bakıldığında birbiri ile zıt gelişim söz konusudur. Yüksek kemik mineralizasyonunun kalça, el ve diz osteoartriti görülme oranını artırdığı saptanmıştır (Bergink ve ark., 2005; Hart ve ark., 2002). Kemik mineral dansitesinin artması, kartilaj dokunun şok absorblama yeteneğinde azalmaya neden olarak osteoartriti tetikleyebileceği düşünülmektedir (Nevitt ve ark., 1995).

1.2.1.3. Beslenme Alışkanlıkları

Yaşa bağlı gelişen bir çok hastalıkta oksidantlara sürekli maruziyetin büyük bir rolü olduğu düşünülmektedir ve osteoartrit de bu hastalıklardan biridir (Felson ve Lawrence, 2000). Öne sürülen bir görüşe göre kondrositler tarafından üretilen serbest oksijen radikalleri kıkırdak dokuda harabiyete neden olmaktadır ve C vitamini gibi antioksidan maddelerin diyetle yer alması hastalıktan koruyucu bir etken olabilir. Aynı zamanda C vitaminin kolajen sentezinde etkili olması diyetteki önemini artırmaktadır (Frei, 1994).

Kemik metabolizmasında D vitamini önemli bir yere sahiptir ve kemiğe binen aşırı yükü hafifleterek kemik hasarına karşı koruyucu etki yapabilmektedir (Arden ve Nevitt, 2006). D vitamini takviyesinin alınmasının osteoartrit gelişimine etkisi incelendiğinde hastalığın ilerleyişinde ve vaka sayısında azalmaya neden olduğu görülmüştür (Lane ve ark., 1999; McAlindon ve ark., 1996).

1.2.1.4. Genetik Faktörler

Osteoartrit, genetik miras nedeniyle görülme riski oldukça yüksek bir hastalıktır (Jonsson ve ark., 2003; Kaprio ve ark., 1996; Lanyon ve ark., 2000). Vitamin D reseptör geni, insülin benzeri büyüme faktör- I geni, kartilaj oligomerik protein geni

ve HLA grubu genlerin hastalığın oluşmasında etkili olduğu düşünülmektedir (Wright ve ark., 1996). Genler; yaralanma, yaralanmaya verilen yanıt, vücut ağırlığı, kas kütle miktarı, kemik yapısı, kemik yapımı ve yıkımı, kıkırdak yapısı, kıkırdak yapımı ve yıkımı gibi olaylarda kompleks bir göreve sahiptir. Osteoartrit hangi mekanizma yolağı ile kalıtsal olduğu çok net değildir. Ancak ileride yapılacak çalışmalar, bu mekanizmayı aydınlatılarak sorumlu genlerin ve yeni yolların keşfedilmesini ve dolayısıyla hedeflendirme yoluyla tedaviye imkan verebileceği düşünülmektedir (Spector ve MacGregor, 2004).

1.2.2. Lokal Biyomekanik Risk Faktörleri

1.2.2.1. Obezite

Obezite osteoartrit için en önemli risk faktörlerinden bir tanesidir ve osteoartrit görülen eklemlerde kötüleşmeyi artıran önemli etkenlerden biridir (Arden ve Nevitt, 2006). Yapılan bazı çalışmalarda kilo kaybının osteoartrit riskini azalttığı görülmüştür (Nevitt ve ark., 1994). Aşırı kilo eklemlere binen yükü artırmakta ve bunun sonucunda kıkırdak dokuda harabiyete neden olmaktadır. Ayrıca obezite hastalarında diyabet ya da lipid anormallikleri gibi metabolik olayların osteoartriti tetikleyebileceği düşünülmüştür (Hart ve ark., 1999; Zhang ve ark., 1998). Son olarak obezitenin osteoartrit üzerine olumsuz etkileri gün geçtikçe önem kazanmaktadır çünkü dünya popülasyonunda obezite görülen birey sayısı artmaktadır (Felson ve Lawrence, 2000).

1.2.2.2. Kıkırdağa Binen Yük

Sağlıklı bir kıkırdak dokuda eklem binen yük, kıkırdağın içerdiği yüksek orandaki su ve proteoglikan-kolajen matris nedeniyle bükülmeye karşı direnç ve geçirgenlik ile tolere edilmektedir. Ancak kıkırdak dokuda görülen patolojik değişiklikler, dokunun moleküler düzeninde bozulmaya ve su bileşiminin artmasına neden olur. Bu değişiklikler kıkırdağın biyomekanik özelliklerini ve dokuya binen yükünü değiştirir böylece çeşitli deformasyonlar oluşabilmektedir (Felson ve Lawrence, 2000).

1.2.2.3. Akut Eklem Hasarı ve Eklem Deformasyonu

Eklemde meydana gelen akut zedelenmeler sağlıklı eklem mekanizmasını etkiler ve eklem binen yükün dağılımını değiştirir. Eklemde meydana gelen akut yaralanmaların ileriki zamanlarda osteoartrit görülmesine neden olabileceği düşünülmektedir. Hasta osteoartrit görülme riskini taşıyorsa, ciddi yaralanmaların bu riski indüklediği söylenebilir (Arden ve Nevitt, 2006). Travma sonrası osteoartrit görülmesinde bireyin vücut kitle indeksi, yüksek hareketlilik ve eklem anatomisinin değişmesi gibi diğer faktörler de etkili olabilmektedir (Felson ve Lawrence, 2000).

1.2.2.4. Mesleki Nedenler

Eklemde aşırı çalışmaya ve eklemi koruyan kasların yorulmasına neden olan çalışma koşulları osteoartrit için bir risk faktörü oluşturmaktadır. Tekstil işçileri ve çiftçiler gibi fiziksel kuvvet gerektiren işlerde çalışanlarda, maruz kalınan eklem göre el, kalça ya da diz gibi bölgesel osteoartrit gelişimi gözlemlenmektedir (Felson ve Lawrence, 2000). Ayrıca merdiven çıkma, engebeli yolda yürüme, ayakta bekleme ve sürekli olarak oturma pozisyonunda çalışan bireylerde de osteoartrit riski bulunmaktadır (Cogon ve ark., 1998).

1.2.2.5. Spor Faaliyetleri

Yapılan çalışmalara göre hafif düzenli koşuların osteoartrit için herhangi bir risk oluşturmadığı ancak yarışma esaslı sporlarda sporcuların risk altında olduğu görülmüştür (Buckwalter ve Lane, 1997; Kujala ve ark., 1995; Newton ve ark., 1997). Sporcularda sıklıkla meydana gelen burkulma ve eklemde ani yükleme kırık ve dejenereasyonu ile ilişkili olarak osteoartrit riskini artırmaktadır (Buckwalter ve Lane, 1997; Kujala ve ark., 1995). Sporcularda görülen bu riski azaltmada bireysel çaba ve dikkat ön plana çıkmaktadır. Sporcu gerekirse dizlik, destek bantları ve ayakkabı gibi çeşitli ekipmanlar kullanarak eklem bölgelerini koruma altına almalıdır. Erken teşhis, etkili tedavi ve tamamlayıcı rehabilitasyon safhaları eklem yaralanmaları için titizlikle yapılarak osteoartrit riski azaltılmaya çalışılmalıdır (Felson ve Lawrence, 2000).

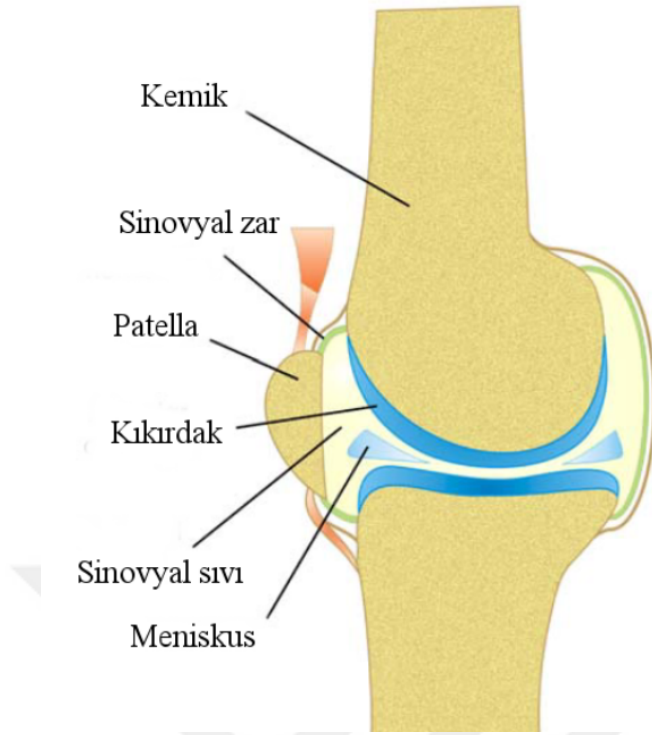
1.3. Sağlıklı Eklem Yapısı ve Fizyolojisi

Eklem, iskeletin bütünlüğünü ve hareketli yapısını sağlayan bir organdır ve sahip olduğu kompleks yapısı ve bileşenleriyle organizmanın çeşitli biyolojik ve mekanik fonksiyonlarına adaptasyon sağlamıştır. Eklemler temel olarak hareket kabiliyetlerine göre; hareketsiz eklemler (synarthroses), hafif hareketli eklemler (amphiarthroses) ve hareketli eklemler (diarthroses, diarthrodial ya da sinovyal eklem) şeklinde sınıflandırılırlar (Gerwin ve ark., 2006).

Sağlıklı bireylerde sinovyal eklem, iki artiküler kemiğin çevresinin kas ve bağ dokusu ile sarılmasıyla oldukça spesifik bir anatomik yapıya sahiptir (Şekil 1.2). Her bir eklem, temas alanına uygun benzersiz bir konfigürasyona sahiptir ve kas hareketleri ile birleşerek oldukça etkili bir performans sergilemektedir. Yapısal bütünlüğü sağlamak için eklem, iç yüzeyi sinovyal zar (synovium) ile kaplı olan fibroelastik bir kapsülle çevrilmiştir. Fibröz kapsülün içinde kalın, birbirine paralel kolajen lifler ve kaslardan, bağ dokusundan, tendondan gelen proprioseptif cevap ve ağrıyı algılayan çeşitli sinir uçları bulunmaktadır. Eklem yüzeyi hiyalin kıkırdak ile kaplıdır ve sinovyal sıvının lubrikant etkisiyle hareket kolaylığı sağlanmıştır. Diz ve Temporomandibular gibi bazı eklemlerin kavitesinde fibrokartilajinöz disk şeklinde eklem stabilitesini ve şok absorpsiyonunu sağlayan menisküs adındaki yapılar mevcuttur. Diz ekleminde ayrıca Patella adı verilen yassı bir kemik yapısı dizin ön tarafında yer almaktadır. (Butoescu ve ark., 2009; Gerwin ve ark., 2006) .

1.3.1. Sinovyal Zar

Sinovyal zar, intima ve subintima olmak üzere iki katmanlıdır ve intima kısmı tip A ve B sinovisit hücrelerinden oluşmaktadır. Yaklaşık olarak sinovyal zar hücrelerinin üçte birini oluşturan tip A sinovisitleri, membran içindeki yıkım ürünlerinin oluşumunu ve temizlenmesini sağlayan makrofajlardır. Tip B sinovisitleri en sık görülen hücrelerdir ve fibroblastlara benzer bir yapıdadır. Oldukça uzun bir aminoglikan olan hyaluronik asit sentezini gerçekleştirmektedir. Subintima tabakası adipoz, fibröz ve gözenekli bir yapıya sahiptir. Sinovyal zarın ekstraselüler matriksi ise; tip VI, III, I ve V kolajen, hyaluronan, fibronektin ve proteoglikanlardan (decorin ve biglycan) oluşmaktadır (Gerwin ve ark., 2006).



Şekil 1.2. Eklem yapısı (Gerwin ve ark., 2006)

Sinovyal zar, eklem homeostazını sağlamak için kritik bir öneme sahiptir. Zarın ekstraselüler matriksi, eklem hidrolük direnç sağlarken aynı zamanda plazmanın kapiller duvarından geçişi ile ultrafiltrasyonunu sağlar. Tip B sinovisitleri tarafından sentezlenen ultrafiltrat ve hyaluronik asit, kıkırdak dokuları arasındaki sürtünmenin azaltılması ve kondrosit metabolizmasında beslenmenin sağlanması için oldukça önemlidir. Sinovyal zar, eklem hücre aracılı ve hümmoral immünite sistemi için anahtar bileşenlere sahiptir. Sinovyal zar içerisindeki karışık kapiller ve lenfatik ağ sayesinde eklem içindeki istenmeyen partiküller temizlenmektedir. Son olarak, sinovyal zar somatik ve otonomik olmak üzere sahip olduğu iki farklı yaygın sinir ağı sayesinde ağrının algılanarak iletilmesini ve sinovyal kan akışının kontrol edilmesini sağlamaktadır (Gerwin ve ark., 2006) .

1.3.2. Sinovyal Sıvı

Sinovyal sıvı plazmaya benzer yapıya sahip, 0.5-2.0 ml hacimde, berrak ve viskoz bir sıvıdır ve lenf kanalları aracılığı ile yaklaşık 2 saatlik periyotlarla yenilenmektedir. Sinovyal sıvı ve plazmanın içerdiği bileşenler ve miktarları Çizelge 1.2 'de yer

almaktadır. Fibrinojen ve globulinler gibi büyük moleküller sinovyal kapiller duvar yüzünden plazmadan kaviteye geçemez bu nedenle daha düşük oranda protein içerir. 10.000 Da altındaki küçük molekül ağırlıklı bileşikler sinovyal sıvıda plazma ile aynıdır. Glukoz miktarı ise kondrosit hücreleri tarafından alındığı için plazmaya göre daha düşük orandadır. Sinovyal sıvıyı plazmadan ayırt eden en önemli unsurlar hyaluronik asit ve lubrisin konsantrasyonlarıdır. Bu iki bileşen sıvının yüksek viskozitesi ve fonksiyonları için esansiyeldir. Sinovyal sıvı, sinovyal zar ve kıkırdak doku üzerinde ince bir tabaka oluşturur ve düşük kayma hızında etkili bir hidrodinamik lubrikasyon sağlar. Burada lubrisin de yüzey aktif fosfolipitlerle etkileşimde bulunarak önemli bir rol üstlenir. Ayrıca hyaluronik asit eklemdeki karşılıklı taraftaki yüzeyleri birbirine bağlayarak gerilme direnci oluşturur. Böylece kemiklerin birbiri üzerinden serbestçe kaymasını sağlarken distraksiyonu önler (Butoescu ve ark., 2009; Gerwin ve ark., 2006).

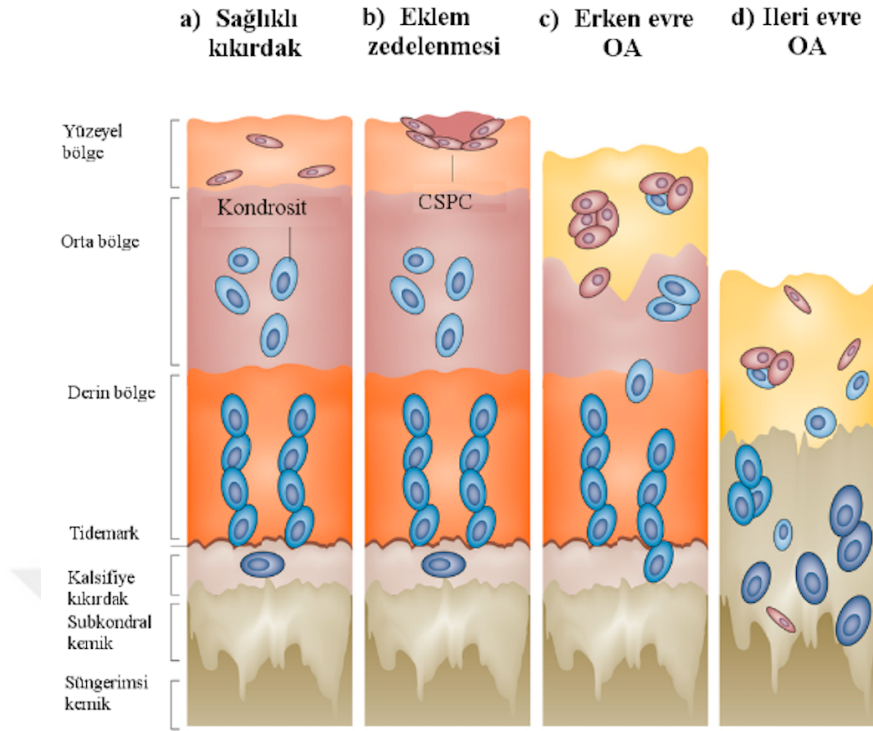
1.3.3. Artiküler Kıkırdak

Eklemde bulunan kemiklerin yüzeyleri hareket esnasında sürtünmeyi önlemek için tip II kolajen ve proteoglikan matristen oluşan 1-5 mm kalınlıkta kıkırdak ile örtülmüştür. Kolajen ağ kıkırdağa gerilme direnci vermektedir, hidrofilik proteoglikanlar ise su absorblayarak basınca karşı direnç sağlamakta ve yükü dağıtmaktadır. Kıkırdak yüzeyi pürüzsüz bir yapıya sahip değildir, yüzeyde belirli çukurluklar ve dalgalanmalar mevcuttur. Kıkırdak dokusu hiposelülerdir; sinir, damar, lenfatik doku içermez ve dokunun beslenmesi iki adımlı bir difüzyon sistemi ile gerçekleşir. İlk olarak kan damarlarından sinovyal sıvıya besin maddeleri geçer daha sonra sinovyal sıvıdan kıkırdak hücrelerine yani kondrositlere ulaşır (Butoescu ve ark., 2009; Gerwin ve ark., 2006) .

Artiküler kıkırdak ile subkondral kemik arasında Şekil 1.3' de görüldüğü gibi kalsifiye kıkırdak tabakası bulunur. Kıkırdak ile kalsifiye kıkırdak tidemark adı verilen histolojik olarak ayırt edilebilen ve kıkırdak dokunun minerilizasyonunu sınırlayan bir yapı ile ayrılmıştır. Kalsifiye kıkırdak hidroksiapatit ile sarılmış ve metabolik olarak inaktif kondrosit içeren tip II kolajen fibril içerir. Kalsifiye kıkırdağın alt yüzeyi kemik son plağı ile birleşmektedir (Gerwin ve ark., 2006; Jiang ve Tuan, 2015).

Çizelge 1.2. Osteoartrit görülen ve sağlıklı bireylerdeki sinovyal sıvı ve plazma bileşimleri (Gerwin ve ark., 2006)

Parametre	Sinovyal sıvı		Plazma	
	Sağlıklı birey	OA görülen birey	Sağlıklı birey	
Fiziksel Parametreler				
Hacim (ml/diz eklemi - ml/vücut ağırlığı)	0,5-2,0	>3,5	39 - 44	
Viskozite (mPa s)	>300 (tikotropik akış)	<300	1,4	
Osmolarite (mOsm/L)	~296	Değişim yok	~290	
pH	7,4	Değişim yok	7,4	
Hücrel Bileşenler				
Eritrosit	<2	Veri yok	4900	
Lökosit	<0,2	<3	7,0	
Monosit/makrofaj (% lökosit)	~60	Veri yok	6,1	
Lemfosit (% lökosit)	~30	Veri yok	35	
Nötrofil (% lökosit)	~10 (~25)	<25	52	
Biyokimyasal parametreler				
Total protein (g/ml)	1,0 - 3,0	1,5 - 3,5	6,5 - 8,0	
Albumin	0,8 - 1,3	Değişim yok	3,5 - 4,5	
İmmünglobulin (% plazma konsantrasyonu)	~50	Değişim yok	100	
α_2 - Macroglobulin (mg/100 ml)	31	Veri yok	270	
Hyaluronik asit (g/100 ml)	0,35	<0,22	$4,2 \times 10^{-6}$	
Lubrisin (g/100 ml)	0,005	Veri yok	Veri yok	
Glukoz (mg/100 ml)	66	Değişim yok	91	
Üre (mg/100 ml)	4,0	Değişim yok	4,0	
Laktat (mg/100 ml)	9 - 16,2	<37,8	9 - 16	
Kalsiyum (mg/100 ml)	4,8 - 9,6	Değişim yok	10	
Klorür (mM)	107,4	Değişim yok	110	
Sodyum (mM)	145	Değişim yok	142	
Potasyum (mM)	4,0	Değişim yok	5	
Demir (μ M/kg)	5,19	Veri yok	Veri yok	
Bakır (μ M/kg)	2,69	Değişim yok	Veri yok	
Çinko (μ M/kg)	4,33	Değişim yok	Veri yok	



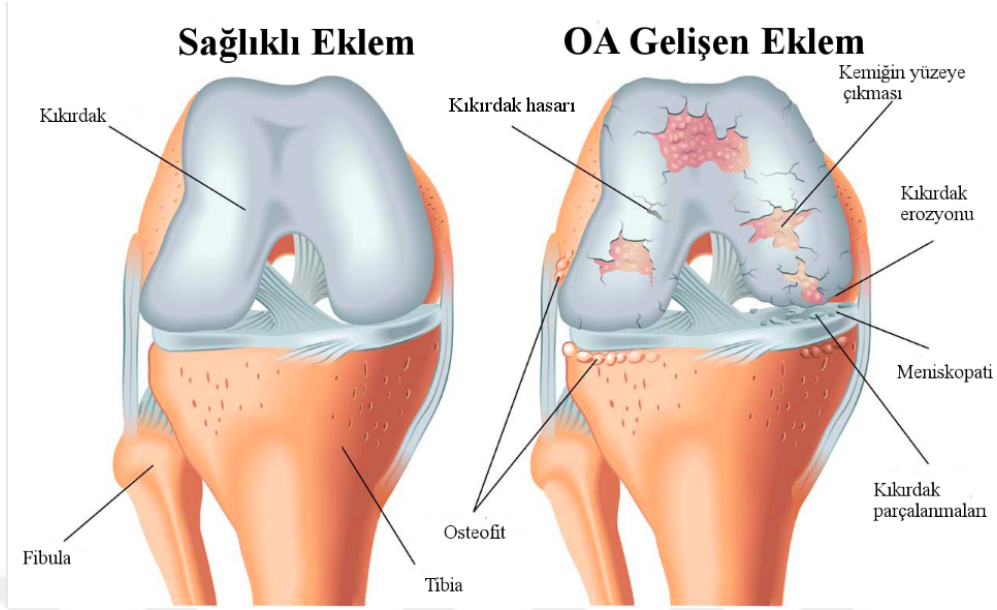
Şekil 1.3. Kıkırdak doku (Jiang ve Tuan, 2015)

1.3.4. Kemik

Kemik histolojik düzeyde incelendiğinde kalsifiye kıkırdağın altında süngerimsi kemik bulunmaktadır. Bu tabakanın altında ise subkondral kemik tabakası yer alır. Subkondral kemik çoğu yerde sert kemikten daha içeridedir ve kendine özgü hava kanalları içermektedir. Subkondriyal kemiğin yapısı nedeniyle sert kemiğe kıyasla yaklaşık on kat daha fazla deforme olabilmektedir (Gerwin ve ark., 2006).

1.4. Osteoartrit Görülen Eklem Yapısı ve Fizyolojisi

Osteoartrit; kıkırdak bölgesinde fokal lezyonların oluşumu ve bu lezyonların spesifik kompartmanlara yayılması sonucunda kıkırdak yüzeyine binen yük dağılımının değişmesi nedeniyle eklem kıkırdağında meydana gelen kayıp ile karakterize bir hastalıktır. Kıkırdak dejenerasyonu kartilaj dokunun fibrilasyonu ile başlamaktadır. Dokuda oluşan çatlaklar ilk olarak kıkırdak yüzeyine paralel oluşmakta ve zamanla subkondral kemiğe ulaşmaktadır (Şekil 1.4). Ayrıca İlk safhalarda yüzeyel bölgelerle sınırlı kondrosit klonlanması görülür. Kıkırdak



Şekil 1.4. Sağlıklı ve osteoartrit gelişen eklem yapısı
(<http://www.bouncepodiatry.com.au/conditions/leg/osteoarthritis-knee/>)

kalınlığındaki kayıp yüzeyden başlayarak ilerlemektedir. Sitokinlerin, büyüme faktörünün ve proteazların fazla miktarda olması ile kıkırdakta bozulmalar görülür. Osteoartritte, romatoid artrite göre inflamasyon gelişimi sınırlıdır ancak sinovisitinin görüldüğü durumlarda sinovyal zarda hiperplazi olur ve lenfositler ile mononükleer hücreler varlık gösterir. Osteoartrit görülen eklemden kemik yeniden şekillenir, kıkırdak çevresinde ve subkondrial kemikte osteofit oluşumu gözlenir. Subkondriyal kemikte sertleşme ve kalınlaşma gözlenir. Kan damarları subkondral kemiğe ve kalsifiye kemiğe penetre olur. Kalsifiye kıkırdak endokondriyal kalsifikasyon kaynağı haline gelir ve subkondriyal kemiğin ve tride markın yeniden şekillenmesine neden olur. Bu yeniden şekillenme sonucunda çoklu tride mark gözlenebilir (Gerwin ve ark., 2006).

1.5. Osteoartrit Tedavi Yaklaşımları

Osteoartrit, genellikle yavaş ve gizli başlangıçlıdır. Klinikte kademeli bir ağrı gelişimi, eklem katılığı ve sınırlı eklem hareketleri ile karakterizedir. Osteoartrit gelişimini; eklem yaralanmaları ve deformasyonları, obezite, mesleki ve mesleki olmayan fiziksel aktiviteler gibi biyomedikal faktörler ile yaş, genetik faktörler, östrojen eksikliği, cinsiyet, düşük kemik mineral yoğunluğu ve etnik köken varlığı

gibi sistemik faktörler önemli derecede etkilemektedir. Osteoartrit tedavi yaklaşımının ana prensibi, özellikle ağrının azaltılması ve eklem fonksiyonlarının yerine konması şeklindedir. Bu amaçla hayat tarzının değiştirilmesi, termal tedaviler, akupunktur, uygun egzersizlerin yapılması gibi nonfarmakolojik tedbirler ile farmakolojik tedavi yaklaşımları bir arada kullanılmaktadır. Medikal tedavi genellikle *American College of Rheumatology*, *European League Against Rheumatism* ve *Osteoarthritis Research International* gibi uluslararası örgütlerin geliştirdiği rehberlere göre yürütülmektedir (Gerwin ve ark., 2006).

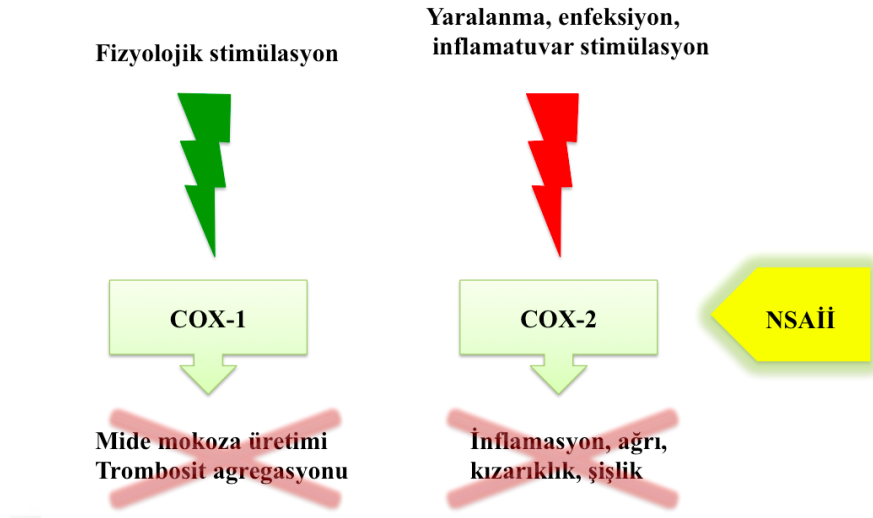
Osteoartritin patofizyolojisi tam olarak anlaşılmadığı için hastalığı önleyici ya da küratif tedavisi yapılamamakta, ancak hastanın yaşam kalitesini artırmak amacıyla semptomları hafifletmek için ilaç tedavisi uygulanmaktadır (Pradal ve ark., 2012). Tedavide genellikle analjezik ve antiinflamatuvar etki için sistemik olarak NSAİİ' ler kullanılmaktadır ancak bunların uzun süreli kullanımı sonucunda istenmeyen GIS ve renal yan etkileri görülebilmektedir. Selektif COX-2 inhibitörleri de analjezik etkinlik için bir başka etkin madde grubudur. Ayrıca topikal olarak kapsaisin gibi maddeler de NSAİİ'lere alternatif olarak kullanılabilir. Antiinflamatuvar etkinliği sebebiyle kortikosteroidler de osteoartrit tedavisinde kullanılmaktadır ancak yan etkilerini elimine etmek için İA kullanımı mevcuttur ve genellikle lidokain gibi lokal anestezi maddelerle kombine halde kullanılmaktadır. İA enjeksiyon yoluyla hyaluronik asit gibi viskoz maddelerin eklem içine uygulanması da bir başka tedavi yaklaşımıdır ve sinovial sıvının viskoelastisitesini iyileştirerek eklem hasarını azaltmaktadır. Son olarak ise kıkırdak hasarını durduran ve eklem fonksiyonel bütünlüğünü restore eden hastalık modifiye edici ilaçlar kullanılmaktadır (Butoescu ve ark., 2009). Tez kapsamında osteoartrit tedavisinde NSAİİ'lerin kullanımı incelenmiş ve bu gruba ait özellikler irdelenmiştir.

1.5.1. Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçlar (NSAİİ)

Narkotik analjezikler dışında kalan analjeziklere, bu grup ilaçların farmakolojik etki profiline daha uygun olan bir ad ile non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar denilmektedir. Bu grup analjeziklerin antiinflamatuvar etkinliği steroid yapıdaki glukortikoidlere göre daha zayıftır. Analjezik etkinlikleri ise güçlü analjezikler olan, fakat antiinflamatuvar etkinliği bulunmayan narkotik analjeziklere göre genellikle daha azdır. Ancak, ilaç bağımlılığı yapmaması, uyuşukluk ve bilinç bulanıklığı

oluşturmadıklarından ağrılı hastalıkların çoğunda tercihen kullanılmaktadırlar. Özellikle iskelet-kas sistemi hastalıklarında ve inflamasyona bağlı uzun süre analjezik ilaç verilmesini gerektiren durumlarda oldukça yararlıdırlar. Bağımlılık yapmamaları, antiinflamatuvar etkilerinin bulunması ve terapötik etkilerine karşı tolerans oluşmaması bu grup ilaçların değerini artırmaktadır (Kayaalp, 2005; Richy ve ark., 2004).

NSAİİ'lerin sergilediği analjezik ve antiinflamatuvar etki, prostaglandin sentezi inhibisyonu ile gerçekleşmektedir. Prostaglandin sentez yolağının ilk basamağında fosfolipaz enzimi ile yağ asitlerinden araşidonik asit sentezlenir. Daha sonra siklooksijenaz enzimi ile Prostaglandin G_2 (PGG_2) ve bu substrattan da peroksidaz enzimleri ile Prostaglandin H_2 (PGH_2) sentezlenir. PGH_2 substrattan ise enzimler yardımıyla prostaglandinlerin ve tromboksanların sentezi gerçekleşir. Bu yolakta yer alan siklooksijenaz enzimleri COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki çeşittir ve benzer yapılara sahip olmalarına rağmen farklı etkileri vardır. COX-1 enzimi endotel hücreleri, monositler, plateletler, renal toplama kanalları ve seminal vesikül gibi bazı hücre ve dokularda fizyolojik olarak yüksek konsantrasyondadır. COX-2 enzimi ise sağlıklı dokularda dedekte edilemez ve vasküler endotel, osteoklast, romatoid sinovyal endotel hücreleri, monositler ve makrofajlar gibi doku ve hücrelerde inflamasyon mediatörü olan lipopolisakkaritler (LPS), interlokin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)'nın sentezini indükler. NSAİİ grubu ilaçlar Şekil 1.5' de görüldüğü gibi siklooksijenaz enzimlerinin inhibisyonunu sağlayarak sentez yolağını durdurmaktadır. NSAİİ'lerin çoğu hem COX-1 hem de COX-2'yi inhibe etmeleri inflamasyonu önlemelerinin yanı sıra bir takım yan etkileri de beraberlerinde getirmelerine neden olur. COX-1 enziminin inhibe edilmesi ile, gastrik mukozada koruyucu etkileri olan PGI_2 ve PGE_2 prostaglandinler üretilemez ve bu nedenle gastrik ülser gibi GİS rahatsızlıkları meydana gelebilir. Bu fonksiyonuna ek olarak PGE_2 , vasküler kan akışını ayarlayarak böbrek fonksiyonlarının işleyişi için önemli bir rol alır. Bu nedenle NSAİİ'lerin böbrek toksisitesi yapması olası yan etkilerindendir (Rao ve Knaus, 2008; Williams ve ark., 1999). Osteoartrit tedavisinde bugüne kadar ağırlıklı olarak sistemik tedavi üzerinde durulmuştur. Ancak tedavi amaçlı kullanılan NSAİİ'lerin yan etkileri ciddi problemlere yol açmaktadır. Kronik hastalıkların doğası gereği bir ilacın uzun süreli sistemik olarak kullanılabilmesi için minimum yan etkiye neden olmalıdır. Bu nedenle eklem içine lokal uygulama ön plana çıkarak inflamasyonun olduğu bölgede hem yüksek etkin madde konsantrasyonuna ulaşılması hem de sistemik uygulamaya göre özellikle GİS sistem üzerindeki yan etkilerin minimuma indirilmesi sağlanmıştır (Butoescu ve ark., 2009; Gerwin ve ark., 2006).



Şekil 1.5. NSAİİ'lerin COX enzimlerini inhibisyonu (Rao ve Knaus, 2008; Williams ve ark., 1999)

1.5.2. NSAİİ'lerin Eklem İçi Enjeksiyonu

Osteoartrit tedavisinde kullanılan piyasadaki çoğu ilaç, oral yol ile kullanılan hızlı salım tablet ya da kapsül şeklindedir. Ancak mevcut olan veya kullanıma aday olan pek çok ilaç terapötik açıdan oldukça etkili olmasına rağmen oral yol ile kullanıldıklarında düşük biyoyararlanım sergileyebilmektedir. İlaçların oral yol ile alımı klinik toksisite açısından da önemlidir. Oral yol ile uygulanan etkin maddenin gerekli terapötik doza ulaşabilmesi için yüksek dozlarda kullanılması nedeniyle sıklıkla toksisite gözlemlenmektedir (Petit, 2014). Artrit tedavisi amacıyla kullanılan NSAİİ'lerin özellikle gastrointestinal sistemde ülser ve gastrit gibi istenmeyen etkileri mevcuttur. Örneğin tenoksikam kullanan hastaların % 11,4'ünde gastrointestinal rahatsızlıklar görülmüştür (Sweetman, 2009). NSAİİ'lerin bu olası yan etkileri kronik hastalıklarda kullanımını güçleştirmekte ve bu yan etkilerini azaltacak yeni uygulama arayışlarını doğurmaktadır.

Osteoartrit tedavisi için bir hekim tarafından intraartiküler enjeksiyon şeklinde uygulanabilen piyasa preparat örnekleri Çizelge 1.3' de yer almaktadır. Çizelgede yer alan hyaluronik asit türevleri sinovyal sıvı hacmini artırmak amacıyla genellikle belirli aralıklarla toplam 3 doz olacak şekilde eklem içine uygulanır. Steroid türevi ilaçlar ise osteoartrit kaynaklı sinovisit gelişimi gibi akut durumlarda uygulanmaktadır.

Çizelge 1.3. Piyasada yer alan intraartiküler kullanılan preparat örnekleri (Üstünes, 2016)

Etkin Madde	Müstahzar Adı	Doz (mg/ml)	Hacim (ml)	Dozaj Formu
Hylan G-F 20 (Sodyum hyaluronat)	Synvisc	8	2	Kullanıma hazır enjektör
Hylastan SGL-80 (Modifiye edilmiş ve edilmemiş hyaluronan polimeri)	Jonexa	10.5	4	Kullanıma hazır enjektör
Sodyum Hyaluronat	Adant	10	2,5	Kullanıma hazır enjektör
Sodyum Hyaluronat	Ostenil	10	2	Kullanıma hazır enjektör
Betametazon asetat /sodyum fosfat	Celestone	3+3	1	Enjektabl süspansiyon içeren ampül
Betametazon sodyum fosfat /dipropiyonat	Diprospan	2+5	1	Enjektabl süspansiyon içeren ampül
Deksametazon fosfat	Onadron	4	2	Ampül
Triamsinolon asetonid	Kenacort-A	40	1	Ampül
Triamsinolon hekzasetonid	Artropan	20	1	Enjektabl süspansiyon içeren ampül
Lidokain hidroklorür	Jetosel	20	2	Ampül

Lokal anestezik grubu içerisinde yer alan ilaçlar ise osteoartrit üzerine etkili olmamakta sadece invaziv işlemde kaynaklanan etkileri gidermek için kullanılmaktadır. Bu preparatların uygulanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli husus herhangi bir kontaminasyonu önlemek açısından çalışma ortamının ve kullanılan ortamın hijyenik koşullarının sağlanmasıdır (Üstünes, 2016).

Artritin lokal olarak gelişmesi, ilacın direkt olarak inflamasyonun olduğu ekleme yan etkilerin minimize edilerek İA yoldan uygulanma fırsatı verir. Buna ek olarak, artritin oldukça sık görüldüğü diz, kol ve ayak eklemleri İA uygulama için oldukça elverişlidir. Ayrıca İA plasebo uygulamalarında % 36-86 arasında değişen olumlu sonuçlar alınmış olması eklem içi uygulamalarını daha cazip hale getirmektedir (Gerwin ve ark., 2006). İlacın doğrudan ilgili dokuya verilmesi, daha düşük dozda ilaç kullanımı, istenmeyen yan etkilerin ortadan kaldırılma imkanı lokal uygulamayı cazip hale getirmektedir. Ayrıca artrit gelişen eklemde lokalize halde bulunması eklem içi uygulamayı öne çıkarmaktadır. Bütün bu avantajlı özellikler birleştirildiğinde ise; NSAİİ'ler gibi sürekli kullanımında istenmeyen etkilerin gözlemlendiği ilaçların İA olarak kullanılması akıllıca olacaktır.

1.5.2.1. NSAİİ'lerin İntraartiküler Uygulamasını Sınırlayan Unsurlar

Son zamanlarda oldukça revaçta olan, ilaçların doğrudan eklem içine verilmesinin son derece önemli avantajlarının yanında bazı problemleri de söz konusudur. İlaçların İA uygulanmasının; enfeksiyon gelişimi, enjeksiyon sonrası şişme, sinovial kavitenin tolere edebildiği hacmin sınırlı olması, enjeksiyonun doğru bölgeye uygulanmama ihtimali, enjeksiyon işleminin yapılabilmesi için bir uzmanın gerekliliği gibi bazı dezavantajları vardır (Butoescu ve ark., 2009; Edwards, 2011). İntra artiküler enjeksiyonun bir diğer olumsuz özelliği ise sinovyal sıvıda etkin maddenin kalma süresinin oldukça az olmasıdır. Etkin madde molekülleri büyük oranda molekül büyüklüğüne bağlı olarak lenfatik drenaj ile sinovyal sıvıdan uzaklaştırılmaktadır. Ayrıca, eklemde bir inflamasyon geliştiği zaman, total protein miktarında artma olur ve sinovial sıvı hacminde artış görülür. Bu hacim artışının etkisiyle, permeabilitede bir artış gözlenir ve lenfatik sistemin drenaj kapasitesi artar. NSAİİ'lerin eklem içine uygulamalarının klinik açıdan anlamlı olabilmesi için enjeksiyon sıklığının birkaç haftada bir, hatta ayda bir şeklinde yapılacak şekilde olmalıdır. Bu amaçla, etkin maddenin doğrudan ilgili eklemde salımını gerçekleştirerek etki bölgesinde yüksek etkin madde konsantrasyonuna olanak veren ve aynı zamanda sistemik toksisite riskini azaltan çok çeşitli modifiye salım sistemleri geliştirilmektedir. İntraartiküler uygulamalarda modifiye salım sistemi olarak sıklıkla lipozom, nanopartiküller, mikropartiküller ve enjekte edilebilen jel sistemleri kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2012b; Edwards, 2011; Gerwin ve ark., 2006).

1.5.2.2. Eklem İçine Uygulanan Modifiye Salım Sistemler

İntraartiküler tedavi, ilacın etki bölgesine hedeflenmesini ve aynı zamanda sistemik toksik etkinin minimize edilmesini sağlamaktadır. Ancak; İA enjeksiyon sonrasında etkin madde hızlı bir şekilde sistemik dolaşıma geçmektedir. Bu nedenle, eklem içinde sürekli bir terapötik etkinin sağlanabilmesi için modifiye salım sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Modifiye salım sistemlerinin kullanılmasıyla; hedeflenen dokuda etkin maddenin artrit gelişimini etkileyebilmesi için gerekli olan eklem içi kalış süresini ve etkin madde konsantrasyonunu sağlamaktadır. Modifiye

Çizelge 1.4. Eklem içine uygulanan ilaç modifiye salım sistem örnekleri

Partikül Şekil	Etkin Madde	Kullanılan Polimer	Partikül Boyutu	Salım Süresi (gün)	Eklem içi Kalış Süresi (gün)	Referans
Katı lipit nanopartikül	Selekoksib	Gliserol behenat	257 nm	8	veri yok	(Thakkar ve ark., 2007)
Mikroküre	Lornoksikam	PLGA (75:25)	7.5 μm	30	veri yok	(Zhang ve ark., 2011)
Mikroküre	İndometazin	PLGA (50:50)	50 μm	18	veri yok	(Puebla ve ark., 2005)
Nanoküre	Floresan Madde (DIR)	PLGA (50:50) Eudragit RL	50-250 nm	30	30	(Kim ve ark., 2015)
Mikroküre içinde nanoküre	Brusin	PLGA (50:50)	8-10 μm	>5	veri yok	(Chen ve ark., 2014b)
Manyetik Mikroküre	Diklofenak sodyum	Gelatin	1- 60 μm	30	veri yok	(Saravanan ve ark., 2008)
Konjuge Nanopartikül/ Mikropartikül	Kartojenin	Kitozan	150 nm- 1.8 μm	50	30	(Kang ve ark., 2014)
Mikroküre	Flurbiprofen	Kitozan	5-10 μm	5	veri yok	(Kawadkar ve Chauhan, 2012)
Mikroküre	Metotreksat	PLLA	30-100 μm	15-50	veri yok	(Liang ve ark., 2004)
Termojel	Selekoksib	PCLA-PEG-PCLA triblock kopolimeri	-	100	70	(Petit, 2014)
Mikroküre-Termojel	Brusin	Kitozan	2.5 μm	5 gün	veri yok	(Chen ve ark., 2012b)

salım sistemlerinin sağlamış olduğu bu avantajlar sayesinde İA enjeksiyon sıklığı azalmaktadır (Betre ve ark., 2006; Edwards, 2011; Zhang ve ark., 2011).

Sistemik dolaşıma geçiş ve dokulara dağılım bakımından İA yol, intravenöz dışındaki diğere parenteral uygulamalarla benzerdir. Eklem içerisinde uzun süreli salım yapabilen ve bu salım süresinde eklem içerisinde modifiye salım sisteminin lokalize kalmasını sağlamak için Çizelge 1.4’ de görüldüğü gibi birçok çalışma yapılmıştır. Kitozan, jelatin, PLGA ve PLLA gibi farklı polimerler kullanılarak partiküler sistemler geliştirilmiş ve etkin madde salım süreleri 5 ile 100 gün arasında değişen salım süreleri elde edilmiştir. Örneğin İA uygulamadan sonra lornoksikam çözeltisinin tamamı 5 saat içerisinde sinovyal sıvıdan uzaklaşmasına rağmen lornoksikam yüklü PLGA mikroküreleri ile yapılan çalışmada bu süre 800 saate kadar uzatılmıştır (Zhang ve ark., 2011). Bir başka çalışmada ise PLGA nanopartikülerine betametazon yüklenmiş ve salım 6 haftaya kadar uzatılmıştır (Horisawa ve ark., 2002a). Salım süresini artırmak için PLGA gibi hidrofobik karakterli polimerlerin yanı sıra kitozan gibi hidrofilik polimerler de kullanılmıştır. Kitozana klasik yöntemlerle etkin maddenin enkapsüle edildiği ya da etkin madde ile konjuge edilerek salımın uzamasının sağlandığı çalışmalar da mevcuttur (Kang ve ark., 2014; Kawadkar ve Chauhan, 2012). İntraartiküler uygulama için kabul edilebilir enjeksiyon sıklığı göz önüne alındığında etkin maddenin uygun şekilde enkapsüle edilmesi akılcı bir seçenek olarak gözükmektedir. Ancak etkin madde salımının tek başına artırılması, partiküler sistemin eklem içinde yeterli kalış süresine sahip olmadığı sürece bir anlam teşkil etmeyecektir. Çünkü partiküler sistemin etkin madde salımı sürmesine rağmen eklem bölgesinden ayrılması, lokalize ilaç tedavisi mantığına aykırı olacaktır. Bu nedenle hazırlanan partiküler sistemlerin eklem içi kalış sürelerini artırmak için termojel sistemlerle kombine edildiği akılcı çalışmalar yapılmıştır. Chen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada molekül ağırlığı düşük olan brusin İA uygulamada eklem içinde kalma süresini artırmak ve mikroküreden etkin madde salımı esnasında görülen burst etkisini gidermek amacıyla brusin yüklü mikroküreler ile termojel sistemini beraber kullanmışlardır. Kullanılan termojel sistemi 37 °C’ de jel formuna dönüştüğü için enjekte edilebilirliği uygun olan bir formülasyon tasarlanmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda ise brusin mikroküreden 20 saatten daha kısa sürede salımı, mikrokürelerin termojel ile kombine kullanılarak 60 saate kadar çıktığı gözlemlenmiştir. Ayrıca in vivo olarak farelerde yapılan çalışmada sadece mikroküre enjeksiyonundan sonra, yedinci günde diz ekleminde hiç mikrokürenin kalmadığı, termojel-mikroküre kombinasyonunun ise eklem içindeki mevcudiyetinin hala devam ettiği görülmüştür (Chen ve ark., 2012b).

İntraartiküler uygulanabilen salım sistemleri geliştirilirken sadece salım süresinin uzatılması ve eklem içerisinde kalış süresinin artırılması değil aynı zamanda taşıyıcı sistemde kullanılan polimerin biyogeçimli ve biyoparçalanır olması, parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve hazırlanan ürünün sterilizasyona elverişli olması amaçlanmalıdır (Burt ve ark., 2009).

Osteoartrit tedavisinde eklem içerisine uygulanacak modifiye salım sistemlerinin; etkin madde salım özellikleri, eklem içerisinde kalış süreleri ve eklem içerisinde neden olabilecekleri inflamasyon gelişimi açısından etkili olan parametreler çeşitli başlıklar altında incelenmiştir.

İlaç Taşıyıcı Sistemin Tipi

Eklem içerisine çözelti ya da süspansiyon şeklinde uygulanan etkin maddelerin eklem içindeki yarı ömürleri oldukça kısadır (Butoescu ve ark., 2009). Etkin maddenin eklem içerisindeki kalış süresini artırmak amacıyla Thakkar ve arkadaşları selekoksib yüklü katı lipit nanopartikülleri geliştirmişler ve etkin madde salımını 8 güne kadar uzatmayı başarmışlardır (2007). Kwadkar ve Chauhan'ın yaptıkları bir çalışmada mikropartikül formülasyonları geliştirilmiş ve polimer olarak kitozan kullanılarak fluribrofenin salım süresi 5 güne uzatılmıştır (2012). Liang ve arkadaşları ise; hidrofobik özellikteki PLLA polimerini kullanarak mikropartikül geliştirmiş ve etkin salım süresini 50 güne başarılı bir şekilde çıkarmışlardır (2004). Partiküler sistemlerin yanı sıra termojeller gibi sistemler geliştirilerek etkin madde salım özellikleri modifiye edilmeye çalışılmıştır. Örneğin Petit ve arkadaşları, eklem içerisine verilmek üzere geliştirdikleri hidrofobik PCLA-PEG-PCLA diblok kopolimer termojel formülasyonlarından selekoksib salımı 100 güne kadar uzatmayı başarmışlardır (Petit, 2014). Etkin maddenin salım süresinin; lipit nanopartiküller, polimerik mikropartiküller ve termojeller gibi çeşitli modifiye salım sistemleri aracılığı ile kullanılan materyallerin özelliğine bağlı olarak uzatılabildiği görülmüştür.

Partikül Boyutu

Bölüm 1.3.'de belirtildiği gibi eklem içerisinde gerçekleşen hızlı bir sıvı sirkülasyonu ve eklem içerisinde yer alan Tip A sinovisit hücrelerinin fagozite edebilme özellikleri nedeniyle eklem içerisine verilen modifiye salım sistemlerinin eklem kavitesinden hızlıca uzaklaştırılmaları mümkün olmaktadır. Özellikle 5 μm ' den daha küçük olan yani fagositoz yapan hücrelerden küçük olan partiküllerin hızlıca

sinovyal sıvıdan uzaklaştırıldıkları tespit edilmiştir (Champion ve ark., 2008; Hirota ve ark., 2007; Horisawa ve ark., 2002a,b). Nishide ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 0-20, 20-100 ve 100-200 μm boyutlarındaki mikropartikülleri üç grup halinde eklem içerisine uygulamışlar ve 0-20 μm boyutlarındaki mikropartiküllerin kısmi bir fagositoza uğradıklarını, 20-100 ve 100-200 μm boyutlarındaki mikropartiküllerin fagositoza uğramadıklarını ancak eklem içerisinde inflamasyon oluşumuna neden olduklarını görmüştür (1999). Horisawa ve arkadaşları, ortalama partikül çapı 265 nm olan PLGA nanopartiküller ve ortalama partikül çapı 26 μm olan PLGA mikropartiküllerin karşılaştırıldığı bir çalışmada sinovyal fagositoz incelemesi yapmış ve nanopartiküllerin yüksek oranda fagositoza uğradığını ve ardından 3-7 gün içerisinde sinovyal membrana doğru taşındığını gözlemlemiştir. Mikropartiküllerin ise hem fagositoza uğramadığı hem de sinovyal membrana doğru taşınmadığı kaydedilmiş ancak mikropartiküllerin inflamasyon oluşumunu tetiklediği görülmüştür (Horisawa ve ark., 2002b). Sistemik olarak uygulanan modifiye salım sistemlerinin aksine, osteoartrit görülen eklem içerisine enjeksiyon yönteminde eklem patolojik durumu nedeniyle modifiye salım sistemlerinin protein ve enzimlerle daha fazla etkileşim içinde olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle eklem içerisine verilecek modifiye salım sistemlerinin ilave bir inflamasyon oluşumunu tetiklemeyecek özellikte olması istenir (Butoescu ve ark., 2009). İlaç taşıyıcı sistemlerin eklem içerisinde fagositoza uğramadan uzun süreli lokalizasyonunun sağlanması ve eklem içerisine enjeksiyonu sonrasında herhangi bir inflamasyon oluşturmaması için, İA uygulanacak bir modifiye salım sisteminin sahip olması gereken ideal partikül büyüklük aralığının 5-15 μm arasında olduğu düşünülmektedir (Butoescu ve ark., 2009; Pradal ve ark., 2012).

Partikülün Şekli ve Yüzey Yükü

Partiküllerin boyutunun yanı sıra şekilleri de oluşan inflamasyon cevap üzerinde etkilidir. Küresel şekilli partiküllerin düzensiz şekilli partiküllere göre eklem içerisinde inflamasyon oluşumunu daha az tetiklediği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Liggins ve ark., 2004; Ratcliffe ve ark., 1984).

Partikül yüzey yükünün modifiye salım sisteminin eklem içinde kalış süresi üzerinde etkisi incelenmiş, Kim ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada pozitif yüzey yüküne sahip partiküllerin eklem içinde kalış sürelerinde artış görülmüştür. Pozitif yüklü partikülün eklem kavitesinde kalış süresinin artmasının, eklem sıvısında bulunan hyaluronik asit gibi negatif yüklü bileşenlerle elektriksel olarak

etkileşmesiyle ipliksi yapılar oluşturmaları sonu gerçekleşebileceğini ifade etmişlerdir. (2015).

Enjekte Edilen Partikül Miktarı

Nishide ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada eklem içine enjekte edilen partikül miktarının 5 mg' dan 40 mg' a çıkmasıyla tavşanların beyaz kan hücresi miktarında önemli bir artış olduğu görülmüştür (1999). Bu çalışmanın aksine, paksitaksiyel yüklü PLGA mikropartikülleri ile yapılan başka bir çalışmada 15 - 75 mg aralığında değişen tek seferde enjekte edilen partikül miktarı sağlıklı tavşan diz eklemine incelenmiş ve önemli bir fark görülmemiştir (Liggins ve ark., 2004).

İlaç taşıyıcı sistemlerin eklem içinde kalış süresini ve eklem içerisine enjeksiyonları sonrasında tetikleyebilecekleri olası inflamasyon oluşumunu etkileyen parametreler incelendiğinde, eklem kavitesine uygulanan modifiye salım sisteminin tipi, partikül boyutu, partikül şekli, yüzey özellikleri, kullanılan polimer ve enjekte edilen miktarının enjeksiyon sonrası inflamasyon oluşumunda ve eklem içi kalış süresinde etkili olduğu görülmüştür.

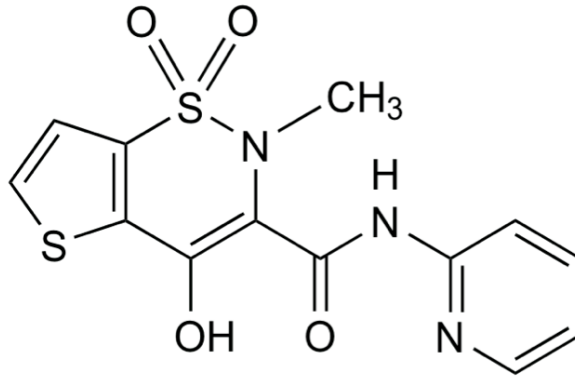
1.5.3. Tenoksikam

1.5.3.1. Tenoksikamın Fizikokimyasal Özellikleri

Tenoksikam; $C_{13}H_{11}N_3O_4S_2$ kapalı formülüne sahip (Şekil 1.6), 337,4 molekül ağırlıklı, sarı renkli, polimorfik, kristal yapısında, pratik olarak suda çözünmeyen diklorometan (DCM) gibi organik solvanlarda çözünebilen, ışık etkisiyle bozulan bir etkin maddedir. Bunlara ek olarak tenoksikam, asidik ve alkali ortamlarda çözünen zwitter iyon özelliği gösteren bir maddedir (Sweetman, 2009).

1.5.3.2. Tenoksikamın Farmakodinamik Özellikleri

Tenoksikam, NSAİİ sınıfında yer alan piroksikama benzer yapısıyla oksikam grubu ilaçlar içerisine girmekte ve analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etkisinin



IUPAC Adlandırması: 4- Hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridyl)-2H-thieno[2,3-e][1,2]thiazine- 3-carboxamide 1,1-dioxide.

Şekil 1.6. Tenoksikamın moleküler yapısı (Sweetman, 2009)

yanında platet agregasyonunu da inhibe etmektedir. Tenoksikam, araşidonik asit metabolizmasında COX enzimini dolayısıyla prostaglandin sentezini inhibe ederek antiinflamatuvar etki göstermektedir. İnsan hücreleri kullanılarak hazırlanmış COX izoenzimi üzerinde yapılan araştırmalarda tenoksikamın COX-1 ve COX-2 izoenzimlerini yaklaşık aynı oranda inhibe ettiği gösterilmiştir. İn vitro lökosit peroksidaz testleri ile fagositoz ve çeşitli lökosit fonksiyonlarını önleyerek ve inflamasyon bölgesindeki aktif oksijen radikallerini bir süpürücü gibi ortadan kaldırarak antiinflamatuvar etkiye katkıda bulunmaktadır. Tenoksikam ayrıca kıkırdak yıkımını indükleyen insan metalloproteinazların (stromelisin ve kollajenaz) güçlü bir in vitro inhibitörüdür (Kalan, 2010).

1.5.3.3. Tenoksikamın Farmakokinetik Özellikleri

Tenoksikamın oral ve intramuskuler emilimi hızlı ve tamdır. Tenoksikamın ortalama görünür dağılım hacmi 10-12 L'dir. Kanda ilacın % 99'undan fazlası albümine bağlıdır. Tenoksikam, sinoviyal sıvıya iyi geçer; ancak maksimum konsantrasyonlarına plazmada olduğundan daha geç ulaşır. Önerilen doz rejimi günde bir kez 20 mg'dır. Bu doz ile kararlı duruma, birikim olmadan 10-15 gün içinde ulaşılır. Günlük 20 mg oral dozlarda verildiğinde tenoksikamın ortalama kararlı durum konsantrasyonu 10 µg/ml'dir ve bu değer 4 yıla kadar süren uygulamalarda bile değişmemektedir. Tek doz uygulama sonuçları, verilen tenoksikamın % 0,2' sinin anne sütüne geçtiğini ortaya koymaktadır. 20 mg IV tenoksikam uygulamasını izleyen 2 saat içinde, tenoksikamın vücut doku ve sıvılarına dağılımı nedeniyle, plazma

düzeyinde hızlı bir düşüş gözlenir. Bu kısa dönemden sonra, plazma konsantrasyonları açısından IV ve oral uygulamalar arasında fark görülmemiştir. Tenoksikam bütünüyle vücutta karaciğerde inaktif metabolitleri olan 5'-hidroksi tenoksikam ve glukuronat konjugatlarına dönüşerek elimine edilir ve ortalama eliminasyon yarı ömrü 72 saattir (42-98 saat). Tenoksikamın uzun yarı ömrü oral kullanımda günlük tek doz halinde kullanımına olanak verir ancak uzun süreli kullanımlarında toksisite riskini azaltmaya yeterli olmayabilir. Total plazma klirensi 2 ml/dk' dır. Tenoksikam, farmakolojik olarak inaktif metabolitlerine tamamen dönüştükten sonra atılır. Oral dozun 2/3' ü tenoksikamın başlıca inaktif metaboliti olan 5'-hidroksi tenoksikam halinde idrarla, geri kalan kısmı ise glukuronat konjugatları halinde safra ile atılır (Day, 1991; Üstünes, 2016).

1.5.3.4. Tenoksikamın Endikasyonları

Tenoksikam sahip olduğu farmakolojik etkilerden dolayı ağırlı inflamasyonlarda ve dejeneratif iskelet kas sistemi rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. Romatoid artrit, osteoartrit, artroz, ankilozan spondilit ve tendinit, bursit, omuz ve kalça periartriti, burkulma ve incinmeler, akut gut ve postoperatif ağrı gibi eklem rahatsızlıkları dışındaki olgularda da endikedir (El-Gazary, 2000; Üstünes, 2016). Tenoksikamın Türkiye piyasasında yer alan müstahzarları Çizelge 1.5' de gösterilmiştir.

1.5.3.5. Tenoksikamın İntraartiküler Kullanımı

Tenoksikam ile ilişkili yan etkilerin başında gastrointestinal sistem üzerindeki istenmeyen etkileri (% 11,4) gelmektedir. Ayrıca sinir sistemi (% 2,8) ve deri (% 2,5) üzerine çeşitli yan etkileri olduğu görülmüştür (Sweetman, 2009). Tenoksikamın uzun süreli kullanımında bu yan etkilerini azaltmak amacıyla intra artiküler uygulanması düşünülmüştür. Papathanassiou yapmış olduğu çalışmada 1 ml ksilokain ve 2 ml tenoksikam (20 mg) ampüllerini karıştırarak 58 yaş ve üzerindeki dejeneratif osteoartrit görülen hastalara uygulayarak 10.gün, 1. ay ve 2. ay olmak üzere ağrı değerlendirmesi, eklem hareketliliği ve hidrartoz (eklemde su birikimi) parametreleri bakımından inceleme yapmış ve sonuç olarak herhangi bir lokal intolerans gelişmeden uzun süreli yarar sağladığını belirtmiştir (1994). Ayrıca yapılan başka çalışmalarda eklem hastalıklarının tanı ve tedavisinde eklem içinin optik bir aletle görüntülenmesi

Çizelge 1.5. Tenoksikamın piyasada yer alan müstahzarları (Üstünes, 2016)

Müstahzar Adı	Dozu	Dozaj Formu
Artroksin	20 mg	Kapsül
İlkoten	20 mg	Kapsül
Nobateks	20 mg	Tablet / Supozituvar
Oksamen	20 mg	Film kaplı tablet / Liyofilize toz içeren flakon
Tenoksan	20 mg	Kapsül
Tenox	20 mg	Kapsül
Tilcotil	20 mg	Film kaplı tablet/ Supozituvar/ Liyofilize toz içeren flakon
Tilko	20 mg	Kapsül
Vienoks	20 mg	Film kaplı tablet
Zikaral	20 mg	Kapsül

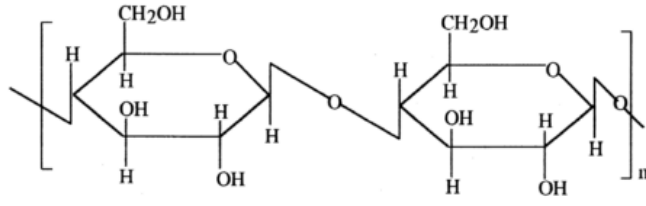
temeline dayanan artroskopi sonrasında, tenoksikamın analjezik ve antiinflamatuvar etkinliği incelenmiş ve herhangi bir intolerans gelişmeden etkinliğin sağlandığı görülmüştür (Aktas ve ark., 2010; Colbert ve ark., 1999; Jawish ve ark., 2015). Tenoksikamın intramuskuler ve intravenöz uygulanması için geliştirilen parenteral formülasyonlarının İA enjeksiyon için tolere edilebilir bir özelliğe sahip olduğu deneysel çalışmalarla gösterilmiş ve tenoksikamın parenteral çözeltilerinin kullanılarak yapıldığı klinik çalışmalarda hastaların yürüme mesafelerinde ve günlük yaşam aktivitelerinde artış olduğu tespit edilmiştir (Evcik ve ark.; Ozyuvaci ve ark., 2004; Papathanassiou, 1994). Ancak tenoksikamın etkinliğinin kısa sürmesi ve çok sık uygulama gerekliliği uzun süreli İA kullanımına olanak vermemekte, eklem içerisinde uzun süreli etkinliğin sağlanabilmesi için tenoksikamın enkapsüle edilebileceği modifiye salı sistemlerinin geliştirilmesine yönelik araştırmaların yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Yapılan literatür incelemeleri sonucunda tenoksikam yüklü bir modifiye salım sisteminin İA olarak kullanıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

1.5.4. Kitozan

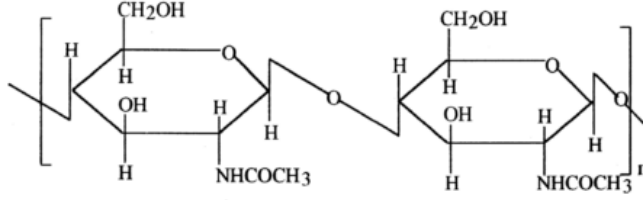
1.5.4.1. Kitozan Eldesi ve Fizikokimyasal Özellikleri

Kitin (poly(β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine), ilk kez 1884 yılında tanımlanmış olan beyaz, sert, elastik olmayan ve azot içeren önemli bir doğal polisakkarittir. Kitin, selülozdan sonra canlı organizmalar tarafından en fazla miktarda sentezlenen biyopolimerdir. Doğada oldukça yaygın bulunan bu polimerin ticari açıdan en önemli kaynakları yengeç ve karides kabuklarıdır. Kitinin kısmi N-deasetillenmiş türevi olan kitozan ise glukozamin ve N-asetilglukozamin kopolimeridir (Şekil 1.7). Kitozan kimyasal sentez ile üretilebildiği gibi doğal olarak da bazı mikroorganizmalar ve mantarlar tarafından üretilmektedir. Ticari olarak kullanılan kitin ve kitozan sahip oldukları yüksek azot oranı (% 6.89) nedeniyle sentetik olan süstitüe selüloza göre daha cazip hale gelmiştir. Ticari kitozan üretim prosesi Şekil 1.8’ de gösterildiği gibi proteinlerden arındırılma, demineralizasyon, renk giderme ve deasetilasyon ana basamaklarından oluşmaktadır (Dutta ve ark., 2004; Kumar, 2000; Rinaudo, 2006).

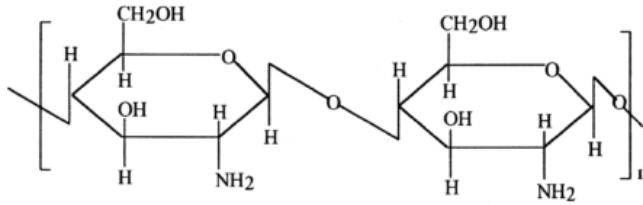
Kitin ve kitozan benzer kimyasal yapıya sahip olmalarına rağmen farklı fizikokimyasal özelliklere sahiptir. Kitin oldukça hidrofobik bir özelliğe sahip olduğu için suda çözünmemekte, hegzafloorisopropanal ve hegzaflooroaseton gibi organik solvanlarda çözünmektedir. Kitozan nötral ve bazik pH’ da serbest amino gruplarına sahip katyonik yapısı ile suda çözünmemekte ancak, asidik pH değerlerinde amino grupları hidrojen alarak çözünür hale geçmektedir. Bu nedenle kitozanın çözünürlüğü serbest amino ve N-asetil gruplarının derecesine bağlıdır. Kitozan genellikle % 1-3 oranlarında asetik asit sulu çözeltilerinde çözünmektedir (Sannan ve ark., 1976). Kitozanın fizikokimyasal özelliklerini temel olarak deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı belirlemektedir. Deasetilasyon derecesi kitozanın çözünürlüğünü ve çözelti özelliklerini etkilemektedir. Kitozanın molekül ağırlığı ise çözeltinin viskozitesi ve kitozanın deasetilasyon derecesi üzerinde etkilidir. Kitozanın molekül ağırlığı arttıkça viskozitesi artarken kitinin kitozana dönüşme sürecinde deasetilasyon derecesi azalmaktadır. Ayrıca kitin ve kitozan erime sıcaklıklarına ulaşmadan önce çoğu polisakkarit gibi degrade olmaktadır. Bu nedenle kitozan ile çalışılırken polimerin eritilmesi yerine uygun solvent sisteminde çözülmesi gerekmektedir. Polimer konsantrasyonu, pH değeri, zıt yüklü iyon varlığı ve ortam sıcaklığı oluşan çözeltinin viskozitesi üzerinde etkilidir (Kumar, 2000).



Selüloz



Kitin

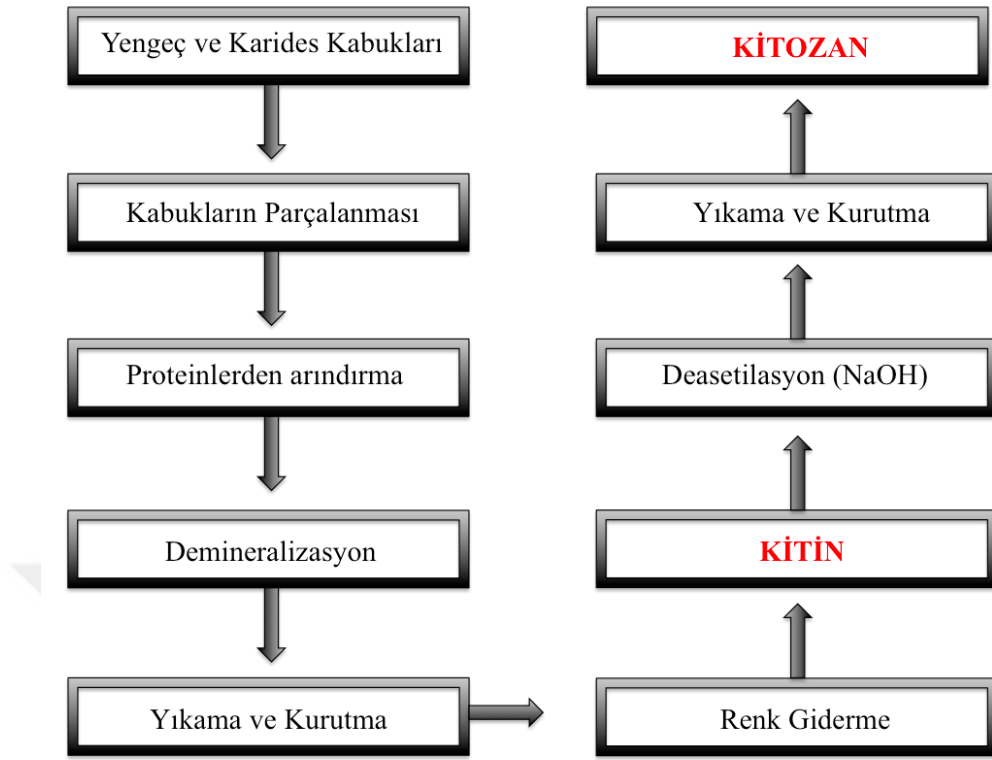


Kitozan

Şekil 1.7. Selüloz, kitin ve kitozanın moleküler yapıları (Kumar, 2000)

1.5.4.2. Kitozanın Farmasötik Alanda Kullanımı

Kitozanın sahip olduğu yüksek molekül ağırlığı ve pozitif yük, ona film oluşturma ve jelleşme özelliklerini kazandırarak onu endüstrinin bir çok alanında cazip hale getirmiştir. Su arıtma sistemleri, zararlı atıkların detoksifikasyonu ve metallerin şelaşyonunda, kozmetik, gıda ve tarım sanayinde aktif olarak kullanılmaktadır. Bu sanayilerin yanı sıra kitozan; biyobozunur, biyogeçimli, nontoksik ve mukoadhezif gibi üstün özellikleri olduğu için farmasötik alanda da ekspiyan olarak ön plana çıkmıştır. Kitozan hem konvensiyonel hem de modern dozaj şekillerinde kullanılmaktadır. Tabletlerin direkt basımını sağlamak ve salımı modifiye etmek, jel ve film oluşturmak, polimerik kaplama yapmak ve ıslatıcı ajan olarak çok çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Ayrıca modifiye salım sistemlerinde biyoadezyon, transmukozal etkin madde geçişi, gen terapisi ve yara iyileştirici bir çok formülasyonda yer almaktadır (Dutta ve ark., 2004; Ilium, 1998). Ekspiyan özelliğine ek olarak kitozanın plazma ve karaciğer trigliserit ve total kolesterol miktarını



Şekil 1.8. Kitin ve kitozanın üretim prosesi (Dutta ve ark., 2004; Kumar, 2000; Rinaudo, 2006)

düşürdüğü, immün sistemi güçlendirdiği, alkali yapısından dolayı peptik ülser vakalarında hazımsızlık gidermeye yardımcı olduğu, antioksidan aktivitesinin olduğu, plazmadaki klor iyonlarını bağlayarak tansiyon düşürücü etkinliğine sahip olduğu, antimikrobiyal etkinliğinin ve antitümör aktivitesinin olduğu düşünülmektedir (Xia ve ark., 2011). Bu etkilerinin yanı sıra kitozanın antiinflamatuvar etkisinin olduğu ve artrit dokunun yenilenmesini sağladığı kabul edilmektedir. Kitozanın inflamasyon oluşumundan sorumlu olan PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$ ve $\text{IL-1}\beta$ gibi prostaglandinlerin sentezini inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterdiği düşünülmektedir (Chou ve ark., 2003). Ayrıca bu etkinlikte kitozanın hidrolizi sonucunda oluşan glikozamin monomerinin etkili olduğu öne sürülmüştür. Glukozamin, kıkırdak dokunun elastikiyet ve direnç kazanmasına yardımcı olan, organizma tarafından üretilen doğal bir aminopolisakkarittir. Kıkırdak bölgesinde meydana gelen yaralanma veya inflamasyon durumlarında glukozamin absorbe edilerek yapısal yenilenmeyi sağlayabileceği düşünülmektedir (Bruyere ve Reginster, 2007). Yapılan klinik çalışmalarda glukozaminin artrit ağrısının iki hafta içinde azalttığı ve hastanın hareket kabiliyetini artırdığı görülmüştür (Bruyere ve ark., 2004). Oral yolla alınan glukozamin ve türevlerinin kanda kalış süreleri düşük olduğu için glukozaminin polimerik formda verilip zamanla parçalanmasını sağlamak alternatif bir strateji

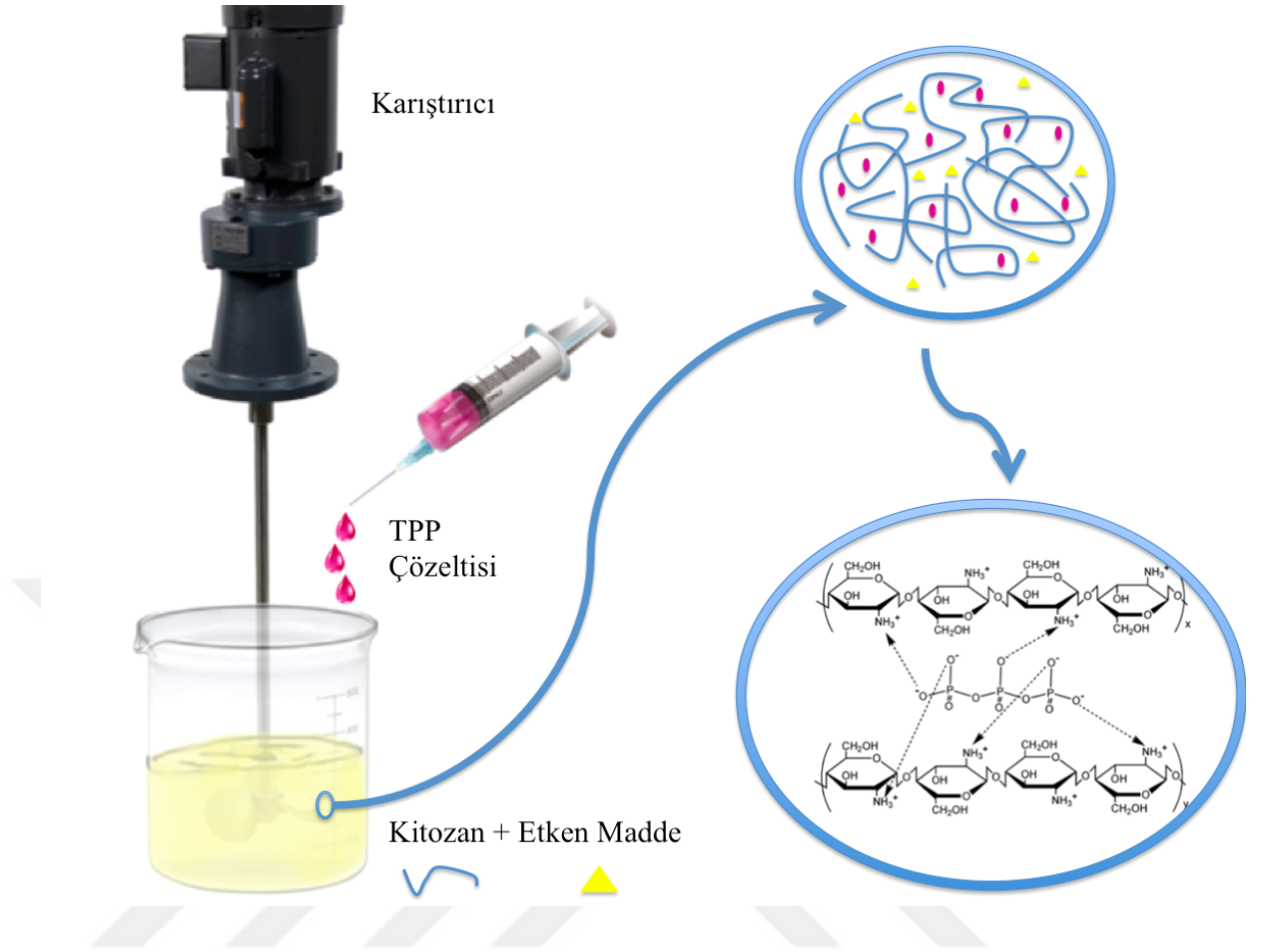
olabileceği belirtilmiştir (Kumar ve ark., 2004). Eklem içine enjekte edilen kitozanın pH 7,4'de enzimatik hidroliz sonucu glukozamin monomerlerini oluşturmaları (Ren ve ark., 2005) ve oluşan glukozaminin antiinflamatuvar etkisinin ve kıkırdak yenilenmesini sağlaması mümkün olabilir. Glukozamin ve ibuprofen ile yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada glukozaminin ibuprofene benzer bir antiinflamatuvar cevap verdiği görülmüştür (Qiu ve ark., 1998). Osteoartrit tedavisinde inflamasyonu önlemek ve kıkırdak doku yenilenmesini sağlamak amacıyla kitozan ve NSAİİ'ler bir arada kullanılarak sinerjik etki oluşturabileceği düşünülmektedir.

1.5.4.3. Kitozan Mikropartiküller

Kitozan partiküllerin hazırlanmasında kullanılan çok farklı metotlar mevcuttur. Partikül üretiminde uygun yöntem etkin maddenin stabilite özellikleri, yöntemin tekrarlanabilirliği, artık madde kalıntı oranı ve final ürünün stabilitesi gibi parametreler değerlendirilerek seçilmelidir (Agnihotri ve ark., 2004). Kitozan bazlı partiküller modifiye salım sistemlerinin üretim yöntemlerini altı başlık altında inceleyebiliriz.

İyonik Jelasyon Yöntemi

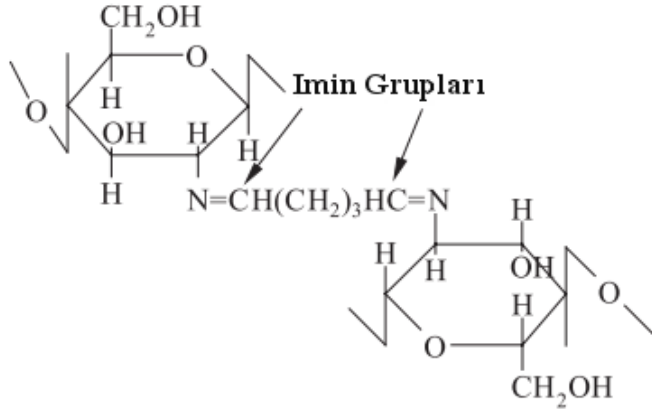
İyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanan mikropartiküller, zıt yüklü makromoleküllerin arasındaki etkileşim sonucunda kompleks oluşması ile meydana gelmektedir. Bu yöntem, basit bir prosese sahip olması ve toksisite riski olan kimyasal çapraz bağlanma yerine elektriksel çekimler sonucu oluşan geri dönüşümlü fiziksel bağların oluşması açısından oldukça revaçtadır (Şekil 1.9). Bir polianyon olan tripolifosfat (TPP) asidik ortamda $P_3O_{10}^{5-}$ anyonuna dönüşür ve katyonik kitozan arasında oluşan elektrostatik çekim kuvvetleri sonucunda mikropartiküller oluşur (Agnihotri ve ark., 2004; Yang ve ark., 2009). Bu yöntemde öncelikle kitozanın sulu çözeltisi hazırlanır. Etkin madde bu çözeltide disperse edilir ya da çözülür. Daha sonra etkin madde-kitozan karışımı yüksek hızda karıştırılırken TPP çözeltisi ilave edilir ve bir süre karıştırmaya devam edilir. Daha sonra santrifüj ile toplanan partiküller distile su ile yıkanır ve kurutulur (Santana ve ark., 2008). Ayrıca yüksek hızda karıştırılan TPP çözeltisine kitozan-etkin madde karışımının ilave edilmesiyle de partiküller elde edilmektedir (Bodmeier ve ark., 1989).



Şekil 1.9. İyonik jelasyon yönteminin şematik hali

Emülsiyon Çapraz Bağlanma Yöntemi

Bu yöntemin temeli kitozanın fonksiyonel amin grupları ile çapraz bağlama ajanının reaksiyonuna dayanmaktadır (Şekil 1.10). İlk olarak kitozanın sulu çözeltisi yağlı fazda emülsifiye edilir. Sulu faz damlacıkları uygun bir sürfaktan ile stabilize edilmelidir. Damlacıklar oluştuğundan sonra gluteraldehit gibi bir çapraz bağlayıcı ilave edilerek damlacıkların sertleşmesi sağlanır. Oluşan kitozan parçacıklar filtre edilerek uygun solvan sistemiyle yıkanır ve ardından kurutulur. Bu yöntemde final ürünün partikül boyutu temel olarak sulu fazın damlacık boyutu ve çapraz bağlayıcı ajan miktarına bağlıdır. Kuru partiküller üzerinde artık çapraz bağlayıcı kalıntısı bu yöntemin dezavantajı olarak sayılabilir (Agnihotri ve ark., 2004).



Şekil 1.10. Çapraz bağlı kitozan (Agnihotri ve ark., 2004)

Koaservasyon Yöntemi

Bu yöntem kitozanın fizikokimyasal özellikleri sonucunda bazik ortamda kitozanın çözünme özelliğini kaybetmesine dayanır. Kitozan çözeltisi, sodyum hidroksit çözeltisi gibi alkali bir ortama püskürtülür ve koaservat damlacıkları oluşur. Oluşan koaservat damlacıkları çapraz bağlayıcı ile sertleştirilir. Daha sonra filtrasyon ya da santrifüj ile partiküller toplanır, arıtılmış su ile yıkama işlemi yapılır. Bu yöntemle üretilen partiküllerin asit ortam stabilitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Agnihotri ve ark., 2004).

Püskürterek Kurutma Yöntemi

Bu yöntem oldukça iyi bilinen ve çok çeşitli amaçlarla kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin prensibi püskürtülen damlacıkların sıcak hava akımında kurutulmasıdır. Kitozanın sulu çözeltisi hazırlandıktan sonra etkin madde bu çözeltide ya disperse edilir ya da çözülür. Daha sonra uygun çapraz bağlayıcı ajan ilave edilir. Ardından hazırlanan bu karışım sıcak hava akımına püskürtülür. Püskürtme ile küçük damlacıklar oluşur ve solvent sıcak havanın etkisiyle ortamdan uzaklaşır. Bu yöntemde partikül büyüklüğünü püskürtücü ağzının büyüklüğü, püskürtme hızı, püskürtme basıncı, sıcaklık ve çapraz bağlayıcı miktarı gibi birçok parametre etkilemektedir (Agnihotri ve ark., 2004).

Ters Miseller Yöntemi

Ters miseller su fazı, yağ fazı ve sürfaktan maddenin termodinamik olarak stabil sıvı karışımlarıdır. Makroskobik olarak homojen ve izotropik, mikroskobik sıkalada ise su ve yağ fazı ince bir sürfaktan tabakası ile ayrılmaktadır. Konvensiyonel

emülsiyonlarla elde edilen partiküller hem partikül boyutunun yüksek olması hem de partikül dağılımının geniş olması açısından dezavantajlıdır. Ters miseller yönteminde ise oldukça küçük partikül eldesi ve kontrollü partikül boyutu dağılımı mümkün olabilmektedir. Yöntemin uygulanışı için öncelikle sürfaktan madde uygun bir organik solventte çözülür. Daha sonra kitozan çözeltisi ve etkin madde karışımı organik faza eklenir. Herhangi bir türbiditeyi engellemek için sürekli bir karıştırma altında fazlar karıştırılmalıdır. Karıştırma işlemi sonucunda optik olarak transparan bir karışım elde edilir, sonrasında çapraz bağlayıcı ilave edilerek karıştırmaya bırakılır. Partiküller sertleştikten sonra organik solvan uzaklaştırılarak kuru bir kütle elde edilir. Daha sonra sürfaktan maddeyi uzaklaştırmak için toz kütle distile suda disperse edilir ve uygun bir tuz eklenerek sürfaktanın presipite olması sağlanır. Partiküller santrifüj edilerek toplanır ve yıkanır. Daha sonra liyofilizasyon ile kurutma işlemi yapılır (Agnihotri ve ark., 2004).

Eleme Yöntemi

Bu yöntemde öncelikle kitozan çözeltisi hazırlanarak etkin madde ile karıştırılır. Daha sonra glutraldehit eklenerek çapraz bağlanma sağlanır ve yapışkan olmayan camsı bir hidrojel elde edilir. Hedeflenen partikül boyutuna uygun olacak mesh büyüklüğüne sahip elekten geçirilir. Oluşan mikropartiküller glutraldehit kalıntısından temizlenmek için sodyum hidroksit çözeltisi ile yıkanır ve kurutulur (Agnihotri ve ark., 2004).

1.5.4.4. Kitozan Bazlı Termojeller

Biyomedikal alanda kullanılan hidrojeller ilk kez 1950-1960 yıllarında Wichterle ve Lim tarafından gündeme getirilmiştir (Wichterle ve Lim, 1960) ve günümüze kadar etkin madde salım sistemleri, doku mühendisliği ve kozmetik alanda popülaritesini korumuştur (Kumar, 2000). Hidrojeller üç boyutlu polimerik ağ yapısı ile su ve diğer biyolojik sıvıları absorblama yeteneğine sahiptir. Jel yapısındaki hidrofilik grupların yapısına göre hidrasyon kapasitesi değişmektedir. Hidrojeller yüksek oranda su absorblama yeteneklerine rağmen sahip oldukları kimyasal ya da fiziksel çapraz bağlar nedeniyle sulu ortamda çözünme yerine şişme davranışını sergilerler. (Hamidi ve ark., 2008).

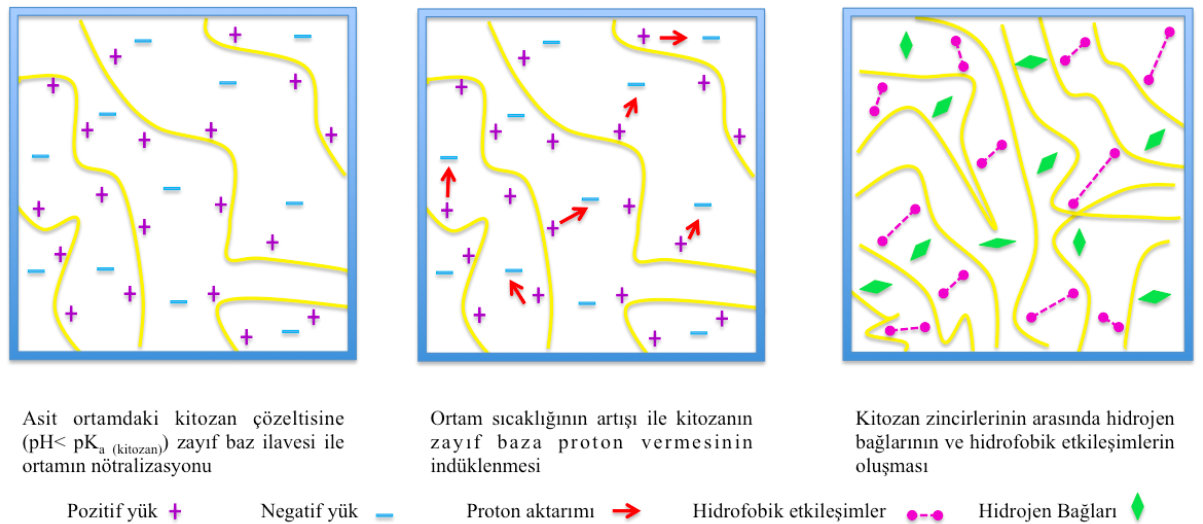
Bir grup hidrojel "akıllı hidrojeller" olarak adlandırılır ve sıcaklık, pH, ışık ya da elektriksel değişimlerden etkilenecek in situ jelleşme eğilimi gösterirler (Sun ve ark., 2007). Sıcaklık etkisiyle jelleşme özelliği değişen jeller "termojeller" ya da "ısıya duyarlı hidrojeller" şeklinde adlandırılırlar ve düşük sıcaklık değerlerinde düşük viskoziteli polimer çözeltileri halinde iken sıcaklık artışı ile sol-jel geçişi sonucu jelleşirler. Termojeller son yıllarda farmasötik alanda fazlaca çalışılmaktadır ve kolay uygulanabilirlik, organik solvan kalıntısının olmaması ve salım özelliklerinin kontrol edilebilmesi gibi birçok avantajı nedeniyle paranteral kullanıma oldukça uygundur (Supper ve ark., 2013). Kitozan termojeller oda sıcaklığında çözelti, vücut sıcaklığında ise jel formuna geçme özelliği ile birçok lokal uygulama için cazip hale gelmiştir. Doku mühendisliği alanında doku yenilenmesini ve biyolojik ürünlerin kontrollü salımı (Huang ve ark., 2014; McLaughlin ve ark., 2012), nazal yolla kontrollü insülin salımı (Chung ve ark., 2010), kanser tedavisinde lenfosit gibi kontrollü hücre ya da peptit-protein salımı (Chen ve ark., 2014a; Monette ve ark., 2016) ve etkin madde salımını (Berrada ve ark., 2005; Ruel-Gariépy ve ark., 2004) sağlamak gibi çok çeşitli amaçlarla kullanılmıştır.

İntraartiküler enjeksiyonunun sık aralıklarla yapılması hasta uyuncu ve sağlığı açısından uygun değildir. Bu nedenle osteoartrit tedavisinde partiküler sistemlerin etkin madde salımının uzatılması amaçlanmakla birlikte aynı zamanda eklem içerisinde kalış sürelerinin de artırılması gereklidir. Bu noktada ise devreye termojel yapıları girmektedir. Yapılan çalışmalarda partiküler sistemlerin termojeller ile kombine halde eklem içine uygulandığı görülmüştür. Arunkumar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada polikaprolakton partikülleri hazırlanarak kitozan termojel içerisinde ratların diz eklemlerine enjekte edilmiş ve çalışma sonucunda mikropartiküllerin eklem içinde kalış süresi 3 hafta iken termojel içerisinde verildiğinde bu sürenin 6 haftaya kadar çıktığı görülmüştür (2016). Aynı şekilde Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da kitozan partiküllerin kitozan termojel içerisinde ratlara uygulanmasıyla eklem içersinde kalış süresinin arttığı gözlemlenmiştir (2012b). Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında bu yaklaşımın başarılı olduğu söylenebilir.

Termojel yapımında poli(N-izopropilakrilamit), poloksamer, polietilen oksit/PLGA, selüloz türevler, ksiloglukan ve kitozan/poliol gibi birçok polimerik materyal kullanılmaktadır (Ruel-Gariépy ve Leroux, 2004). Bu tez çalışmasında kitozan/poliol termojel yapısı incelenmiştir. Kitozan sadece asidik pH'da çözünebilen bir polimerdir ve güçlü bazlarla nötralize edildiğinde çökeltme gerçekleşmektedir.

Chenite ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada herhangi bir çökelme gözlenmeden kitozan çözeltisini nötralleştirmeyi çalışmışlar ve bunu kitozanın pK_a değerine (6,5) yakın, zayıf bir baz olan β -gliserofosfat (6,65) ile sağlamışlardır (2000). Bu sayede nötral kitozan çözeltisinin organizmaya enjeksiyonundaki engel aşılmıştır. Kitozan, pK_a 6,5' den daha düşük pH değerlerinde serbest amin grupları proton alır ve polimer zincirleri arasında itme kuvvetleri artar. Böylece kitozanın çözünmesi gerçekleşir. pK_a değerinden daha yükseklerde ise kitozan zincirleri nötralleşir. Sıcaklığın artması ile kitozan zincirleri hidrasyonlarını kaybederek zincirler arası etkileşimlerle jelleşme prosesi gerçekleşir (Ruel-Gariepy ve Leroux, 2004; Supper ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada sıcaklık artışı ile kitozan zincirlerinden polianiyona proton geçişinin indüklendiği ve böylece kitozan-kitozan etkileşiminin arttığı düşünülmektedir (Lavertu ve ark., 2008). Jelleşme prosesinde üç temel mekanizmanın olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.11);

- Kitozanın pozitif yüklü amonyum grupları ile polianyon arasındaki elektriksel çekim kuvvetleri,
- Kitozan çözeltisinin nötralleşmesinden sonra polimer zincirleri arasındaki elektriksel itme kuvvetlerinin azalması ve hidrojen bağlarının oluşması,
- Kitozan-kitozan hidrofobik etkileşimleri (Ruel-Gariepy ve Leroux, 2004; Supper ve ark., 2013).

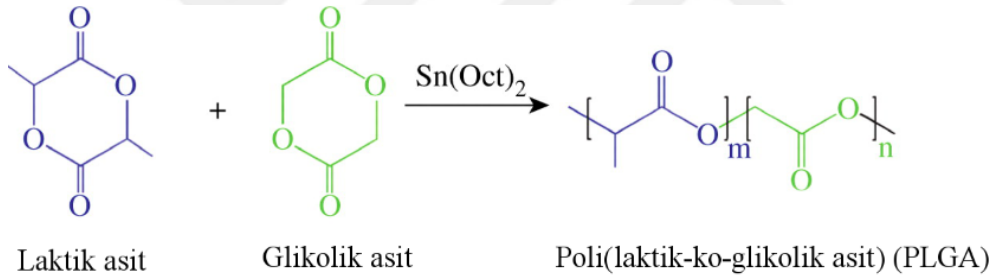


Şekil 1.11. Kitozanın jelleşme mekanizması (Ruel-Gariepy ve Leroux, 2004; Supper ve ark., 2013)

1.5.5. Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)

1.5.5.1. PLGA Eldesi ve Genel Özellikleri

Polilaktik-ko-glikolik asit, glikolik asit ve laktik asit siklik dimerlerinin rastgele halka açılması kopolimerizasyonu ile sentezlenmesinden oluşan bir kopolimerdir (Şekil 1.12). Polimerizasyon esnasında glikolik asit ve laktik asit arasında ester bağları ile bağlanarak amorf alifatik polyester bir ürün oluşturur. PLGA genellikle yapısında bulundurduğu monomerlerin oranına göre tanımlanmaktadır. Örneğin PLGA (50:50), yapısında % 50 laktik asit ve % 50 glikolik asit içerdiğini göstermektedir. PLGA'nın yapısındaki laktik asit oranı arttıkça polimerin lipofilikliği de artmaktadır ve PLGA sahip olduğu lipofilik yapı sayesinde organik solvanlarda çözünmektedir (Danhier ve ark., 2012; Wischke ve Schwendeman, 2008).



Şekil 1.12. PLGA sentezi (Pan ve Ding, 2012)

PLGA'nın yapısında bulunan monomerler organizmada Krebs döngüsüne katılarak kolayca metabolize olur ve çok düşük sistemik toksisite riskine sahiptir. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylı olan PLGA, etkin madde enkapsülasyonu amacıyla sıklıkla kullanılan biyobozunur polimerlerden olmuştur. PLGA'nın su tutma ve degradasyon özellikleri polimerin molekül ağırlığına, polimer zincirlerinin uç gruplarına ve laktik/glikolik asit oranına bağlı olarak değişmektedir. PLGA (50:50) ve düşük molekül ağırlığına sahip polimer genellikle 4-6 hafta süreli bir salım profili vermektedir. Salım süresi artırılmak istenirse laktik/glikolik asit oranı yüksek polimer türevi kullanılabilir. Polimerin su tutma özelliği ise; polimer zincirlerinin metil, etil ve lauril alkol gibi alifatik gruplara kıyasla karboksil grupları ile bitmesiyle artmaktadır (Danhier ve ark., 2012; Wischke ve Schwendeman, 2008).

1.5.5.2. PLGA Mikropartikülleri

Polimerik partiküllerin üretim yöntemlerine göre yapıları değişebilir. Etkin maddenin partikülün çekirdeğinde yer aldığı ve etrafının polimerik bir kılıfla sarılı olduğu oluşumlara nano/mikro-kapsül adı verilirken etkin maddenin polimerik matrikse dağılmış halde bulunduğu şekillere nano/mikro-küre denilmektedir (Danhier ve ark., 2012). PLGA mikropartikülleri üretim yöntemlerini dört başlık altında toplayabiliriz.

Emülsifikasyon- Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Bu yöntemin esası yağ/su ya da su/yağ/su tiplerinde emülsiyonlar oluşturulması ve ardından çözücünün uzaklaştırılması ile katı partiküllerin elde edilmesine dayanmaktadır. Yağ/su tipi emülsiyonlar hidrofobik özellikteki etkin maddeler için uygunken su/yağ/su tipi emülsiyonlar peptit ve proteinler gibi hidrofilik özellikteki etkin maddeler için uygundur. Hidrofilik maddelerin yükleme kapasitesinin çok yüksek olduğu bazı durumlarda etkin maddenin yağ fazında disperse edilmesiyle etkin madde-yağ/su (s/o/w) tipi emülsiyon şeklinde bir tercih de mümkün olmaktadır. Yağ/su tipi emülsifikasyon yönteminde PLGA diklorometan, kloroform ya da etilasetat gibi organik solvanlarda çözülür ve etkin madde bu karışıma eklenerek çözünmesi sağlanır. Daha sonra polivinilalkol (PVA), jelatin ya da polisorbitat gibi bir emülgatör yardımı ile sulu fazda emülsifiye edilir. Stabil bir emülsiyon yapısının sağlanabilmesi için sürekli bir karıştırma yapılmalıdır. Yeterli bir karıştırma süresinden sonra emülsiyon damlacıkları katılaşıp partiküller oluşur. Partikül boyutu karıştırıcı tipi ve karıştırma hızı, emülgatör miktarı ve tipi, yağ ve su fazının viskozitesi ve sıcaklık gibi birçok parametreden etkilenmektedir (Alimohammadi, 2014).

Emülsifikasyon Solvent Difüzyon Yöntemi

Bu yöntemde öncelikle yağ/su tipi bir emülsiyon oluşturulur. Yağ fazını polimer ve etkin maddenin organik solvandaki çözeltisi oluşturur. Su fazını ise sürfaktan maddenin sulu çözeltisi oluşturur. Yağ fazı su fazına eklenerek homojenize edilir ve daha sonra emülsiyon sistemi karıştırılırken saf su eklenir. Bu aşamada faz dönüşümü olur ve iç fazdaki solvan dışarıya difüze olur ve polimerde presipitasyon gerçekleşir ve kolloidal partiküller oluşur. Bu yöntem yüksek enkapsülasyon etkinliği sağlaması,

scale up işlemine olanak sağlaması, tekrarlanabilirliğinin iyi olması gibi avantajlara sahipken fazla miktarda su kullanılması ve hidrofilik etkin maddelerde enkapsülasyon etkinliğinin düşük olması gibi dezavantajlara da sahiptir (Alimohammadi, 2014).

Emülsifikasyon Ters Salting-out Yöntemi

Bu yöntemde polimer ve etkin madde aseton gibi su ile karışabilir bir solvanda çözülür ve sonrasında magnezyum klorür ya da kalsiyum klorür gibi bir salting-out ajanı ve polivinilprolidon gibi bir kolloidal stabilizan içeren sulu çözeltiye aktarılır. Güçlü bir şekilde karıştırma sağlanır ve sonrasında oluşan emülsiyon yeterli miktardaki su ile dilüe edilir. Bu seyreltme işlemi polimerin presipitasyonunu indükleyerek asetonun sulu faza geçmesini sağlar. Dilüsyon işlemi su fazındaki tuz konsantrasyonunda ani bir azalmaya sebep olarak iç fazdaki solvanın emülsiyon damlasından difüze olmasını tetikler. İşlem sonrasında artık solvan ve tuzdan arındırma işlemi yapılmalıdır. Bu yöntemde yüksek sıcaklık kullanılmaması ısıya duyarlı maddeler için bir tercih nedeni olabilir (Alimohammadi, 2014).

Nanopresipitasyon Yöntemi

Nanopresipitasyon yöntemi; polimer, polimer çözücüsü ve polimeri çözmeyen bir çözücü olmak üzere üç temel bileşenden oluşan tek basamaklı bir yöntemdir. Polimer ve etkin madde su ile karışabilen aseton, etanol, metanol ya da asetonitril gibi bir çözücüde çözülür. Daha sonra bu solüsyon sürfaktan içeren sulu çözeltiye damla damla ilave edilir. Hızlı bir solvent difüzyonu sonucunda partiküller hızlıca oluşur (Alimohammadi, 2014).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler ve Kimyasal Maddeler

2.1.1. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Cam malzemeler	Hazer (Türkiye)
Diferansiyal Taramalı Kalorimetri	Shimadzu DSC 60 (Japonya)
Diyaliz Membran Zar	Sigma-Aldrich (Almanya)
Filtre Kağıdı	Whatman (İngiltere)
Fourier Dönüşümlü Infrared	Agilent Cary 630 (Diamond ATR)
Spektrofotometri	(ABD)
Hassas Terazı	Sartorius (Almanya)
Isıtmalı Yatay Çalkalayıcı	Jeitech (Güney Kore)
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC (Almanya)
Manyetik Karıştırıcı	Wisestir (Almanya)
Membran Kısıkaçı	Sigma-Aldrich (Almanya)
Paket Programlar	IBM SPSS 22.0.0.0
	(ABD)
Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı	Malvern Mastersizer 3000 (İngiltere)
Pervaneli Karıştırıcı	IKA Eurostar 20 high speed digital
	(Çin)
pH Metre	WTW InoLab (Almanya)
Plastik Enjektör (23G, 25mm)	Ayset (Türkiye)
Santrifüj Cihazı	Beckman Optima XL-100K
	Sigma B-30KS (Almanya)
Santrifüj Tüpü	Beckman (Almanya)
Su Arıtma Sistemi	Milipor Mili-Q Gradient A10 (ABD)
Taramalı Eklekton Mikroskobu (SEM)	Zeiss EVO LS10 (Almanya)
Ultrasonik Homojenizatör	Bandelin Sonoplus HD 2070
(Prob Sonikatör)	(Almanya)

UV Spektrometre

Shimadzu UV 1240 (Japonya)

Viskozimetre

Brookfield RV Digital Viscometer
(ABD)

Vortex

Ika (Çin)

Zeta Potansiyeli Ölçüm Cihazı

Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments
(İngiltere)



2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum sodyum fosfat	Sigma-Aldrich (Almanya)
dibazik tetrahidrat	
Asetik Asit	Sigma-Aldrich (Almanya)
Boraks	Tekkim (Türkiye)
Dietileter	Tekkim (Türkiye)
Diklorometan	Riedel-de Haen (Almanya)
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat	Merck (Almanya)
Gluteraldehit Çözeltisi,(Grade II, 25% in H ₂ O)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Hegzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Hidroklorik asit	Riedel-de Haen (Almanya)
Kitozan (HMW)	Fluka (Almanya)
Kitozan (LMW)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Kitozan (MMW)	Fluka (Almanya)
Magnezyum Hidroksit	Merck (Almanya)
Poli(laktik-ko-glikolik asit, 50:50)	Sigma-Aldrich (Almanya)
(Molekül ağırlığı: 40-75 kDa)	
Poli(laktik-ko-glikolik asit, 75:25)	Sigma-Aldrich (Almanya)
(Molekül ağırlığı: 66-107 kDa)	
Polivinilalkol (Molekül ağırlığı: 13-23 kDa)	Sigma-Aldrich (Almanya)
Potasyum dihidrojen fosfat	Carlo Erba (Fransa)
Sodyum Hidroksit Pellet	Merck (Almanya)
Sodyum Klorür	Molchem (Hindistan)
Sodyum Tripolifosfat	Sigma-Aldrich (Almanya)
Span 80	Merck (Almanya)
Tenoksikam	Drogsan (TÜRKİYE)
Tween 80	Merck (Almanya)

2.1.3. Tenoksikamın Özelliklerinin Belirlenmesi

2.1.3.1. Tenoksikamın Analizlerinde Kullanılacak Tampon Çözeltinin Hazırlanması

Fosfat Tamponu pH 7,4 (Phosphate Buffered Saline pH 7,4, PBS 7,4 EP 6)

Disodyum hidrojen fosfat R..... 2,38 g

Potasyum dihidrojen fosfat R..... 0,19 g

Sodyum klorür R..... 8,00 g

Arıtılmış su.....ym..... 1000 ml

Çalışmalarda kullanılacak tampon çözelti yukarıdaki formülasyona göre hazırlanmıştır. Formülasyonda yer alan maddelerin tartımı yapıldıktan sonra bir miktar arıtılmış suda çözülür ve sonrasında 1000 ml' ye arıtılmış su ile tamamlanır. Hazırlanan tamponun pH' sı ölçülür ve 7,4' den sapma varsa 0,1 N NaOH ya da 0,1 N HCl ile pH ayarlaması yapılır.

2.1.3.2. Tenoksikamın Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması

Etkin maddenin PBS 7,4 tamponu ve DCM içinde hazırlanmış stok çözeltileri ile validasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla etkin maddenin konsantrasyonu bilinen çözeltileri hazırlanmış ve 200-400 nm aralığında spektrumları alınarak maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları (λ_{max}) belirlenmiştir.

2.1.3.3. Tenoksikamın Kalibrasyon Denklemine Belirlenmesi

Tenoksikamın PBS 7,4 tamponu ve DCM içinde 20 mg/100ml' lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra bu stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 1-18 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarındaki çözeltileri hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltiler daha önceden belirlenmiş λ_{max} değerinde okunmuştur. Bu işlem her konsantrasyon için üç paralel halinde uygulanmış ve okumalar üçer defa yapılmıştır. Her bir konsantrasyon ve buna karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek doğru denklemleri

hesaplanmıştır. Tez çalışması boyunca yapılan analizlerde elde edilen bu denklemler kullanılmıştır.

2.1.3.4. Tenoksikama Ait Kalibrasyon Doğrularının Analitik Validasyonu

Analitik bir yöntemin validasyonu, analitik uygulamaların tasarımı için gereken yöntemin performans karakteristiğini ifade eden bir işlemdir. Performans karakteristikleri analitik parametreler şeklinde tanımlanır. Bir etkin maddenin çeşitli formülasyonlardaki miktar tayininde veya dozaj formundan salım hızının tespitinde kullanılan, ortamdaki miktarının belirlenmesinde seçilen analiz yönteminin validasyonu için ICH Q2(R1) kılavuzunda yer alan doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik (tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik) ve seçicilik (selectivity) (teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (hassasiyet, sensitivity) (LOQ)) gibi parametreler incelenir.

Doğrusallık ve Aralığı

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir aralıkta örnek içindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonu ile test sonuçlarının dorudan orantılı olarak elde edilmesidir. Eğer doğrusal bir ilişki mevcut ise, test sonuçları en küçük kareler yöntemi ile regresyon doğrusunun hesaplanması gibi yöntemlerle bulunabilir. Doğrusallığın oluşturulabilmesi için en az beş konsantrasyonda çalışılması önerilmektedir (ICH Q2(R1)).

Tenoksikamın DCM ve PBS 7,4 tamponu ile 1-18 $\mu\text{g/ml}$ aralığında 7 farklı konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanmıştır. Ölçümler yapılarak konsantrasyonlara karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Doğruluk ve Geri Elde

Bir analitik yöntemin doğruluğu, ilgili yöntemle elde edilen test sonuçları ile gerçek sonuçların yakınlığıdır. Bu işlem, belirli bir aralıkta olan en az üç konsantrasyonda ve en az üçer defa hazırlanan numune miktarlarının yüzde geri eldelerinin belirlenmesiyle yapılır (ICH Q2(R1)). 2, 10 ve 18 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak ortalama % geri elde, standart sapma ve % bağıl sapma değerleri bulunmuştur.

Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, önceden belirlenmiş koşullar altındaki aynı homojen örnekten çoklu örnek alımları arasındaki yakınlığı ifade etmektedir. Kesinlik tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik olmak üzere üç aşamada incelenir (ICH Q2(R1)).

- Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, aynı koşullar altındaki ve kısa zaman aralıklarındaki kesinliği ifade eder. Minimum dokuz tayin (3 farklı konsantrasyon ve 3 defa tekrar) yapılabilir (ICH Q2(R1)). Bu amaçla 2, 10 ve 18 µg/ml konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak ortalama, standart sapma ve % bağıl sapma değerleri bulunmuştur.

- Ara Kesinlik

Ara kesinlik; farklı gün, farklı analist ve farklı ekipman gibi çeşitli varyansların incelenmesini ifade eder. Her bir değişkenin etkisini incelemek zorunlu değildir (ICH Q2(R1)). Bu amaçla 2, 10 ve 18 µg/ml konsantrasyonlarında ölçümler üç farklı günde yapılarak ortalama, standart sapma ve % bağıl sapma değerleri bulunmuştur. Ayrıca günler arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır.

- Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik, laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (işbirliği ile yapılan çalışmalar, genellikle yöntemin standardizasyonu için kullanılır.) (ICH Q2(R1)).

Seçicilik

Seçicilik, analiz edilen maddenin kirlilik, indirgeyici madde ya da matriks gibi diğer bileşenler varlığında tayin edilebilme özelliğidir (ICH Q2(R1)). Bu test için, formülasyonda kullanılan maddelerin ve etkin maddenin absorbe ettikleri dalga boyları incelenmiştir.

Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Teşhis sınırı, bir örnek içinde analiz edilen maddenin teşhis edildiği ancak tayin edilemediği en düşük konsantrasyondur. Tayin sınırı ise örnekteki analiz edilen maddenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile kantitatif olarak tayin edilebilen en

düşük miktardır (ICH Q2(R1)).

Etkin maddenin DCM ve PBS 7,4 tamponu ile yedi farklı konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanmış ve üç paralel olacak şekilde absorbanları okunarak grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmış ve ICH kılavuzunda verilen denklemler kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (ICH Q2(R1)) .

$$LOD = 3.3 \frac{\sigma}{s} \quad (2.1)$$

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{s} \quad (2.2)$$

σ : Regresyon doğrularının y eksenini kesen noktaların standart sapması

s: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

2.1.3.5. Tenoksikamın Çözünme Ortamlarındaki Kısa Süreli Stabilitelerinin İncelenmesi

Etkin maddenin kullanılan çözünme hızı ortamlarındaki dayanıklılığı ile ilgili bilgi edinmek amacıyla PBS 7,4 tamponu ortamındaki kısa süreli stabilite incelemesi yapılmıştır. Kısa süreli stabilite çalışmaları için tenoksikamın PBS 7,4 tamponu içindeki 2, 10 ve 16 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarındaki çözeltileri hazırlanmış ve hazırlanan çözeltiler 37 °C sıcaklıkta 48 saat bekletilmiş ve 0., 24. ve 48. saatlerde numuneler alınarak UV spektrofotometresinde ölçümleri yapılmıştır.

2.1.3.6. Tenoksikamın Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile Analizi

Saf haldeki etkin maddenin termal davranışını tanımlamak amacıyla yapılan DSC analizi için 2 mg hassas olarak tartılan tenoksikam alüminyum bir kapsül içine konarak preslenmiştir. Preslenen kapsül cihaza yerleştirilmiş ve 20-400 °C aralığında termal analizi yapılmıştır.

2.1.3.7. Tenoksikamın Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile Analizi

Tenoksikamın kimyasal yapısının aydınlatılması için yapılan FTIR analizinde belirli miktar tenoksikam alınarak cihazın ışın yolağında yer alan numune yerine yerleştirilmiş ve 400-4000 cm^{-1} dalga sayıları arasında spektrumu alınmıştır. Tenoksikamın FTIR ile analizinde, 14A0237001 Nolu "Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Laboratuvarlarının Altyapısının İyileştirilmesi" başlıklı altyapı projesi ile temin edilen Agilent Cary 630 (Diamond ATR) cihazı ile yapılmıştır.

2.1.3.8. Tenoksikamın Çalışma Ortamlarındaki Çözünürlüğünün Belirlenmesi

Tenoksikamın DCM ve PBS 7,4 ortamlarında çözünürlüğü belirlenmiştir. Çözünebileceğinden daha fazla tenoksikam bir balon jode 100 ml PBS 7,4 tampon ortamında 24 saat karıştırılır ve sonrasında 2 saat çözünmeyen kısmın çökmesi beklenir ve filtrelenerek 1 ml numune alır ve gerekli seyreltmeler yapılarak 367,97 nm'de UV spektrofotometresinde okunur. Aynı işlem DCM ile tekrarlanır ve 345,14 nm'de UV spektrofotometresinde okuma yapılarak çözelti konsantrasyonları bulunur. Ölçüm sırasında yapılan seyreltmeler dikkate alınarak tenoksikamın çözünürlüğü hesaplanır.

2.1.3.9. Tenoksikamın Stabilitate Tayini

Tenoksikamın farklı ortamlarındaki stabilitesinin tayini düşük (2 $\mu\text{g/ml}$), orta (10 $\mu\text{g/ml}$) ve yüksek (16 $\mu\text{g/ml}$) şeklinde 3 farklı konsantrasyonda PBS 7,4 tamponu ile hazırlanan çözeltilerinde incelenmiştir. Hazırlanan çözeltiler 50 ml'lik cam balon jode içerisinde 25 °C' de gün ışığında ve karanlıkta % 60 bağıl nem içeren, 40 °C'de % 75 bağıl nem içeren ve 4 °C'de buzdolabı ortamlarındaki üç aylık stabilitesi incelenmiştir. Etkin madde çözeltilerinden üç ay boyunca belirli aralıklarla numune alınarak UV spektrofotometresinde 367,97 nm' de ölçümler alınmış ve konsantrasyon değişimleri belirlenmiştir.

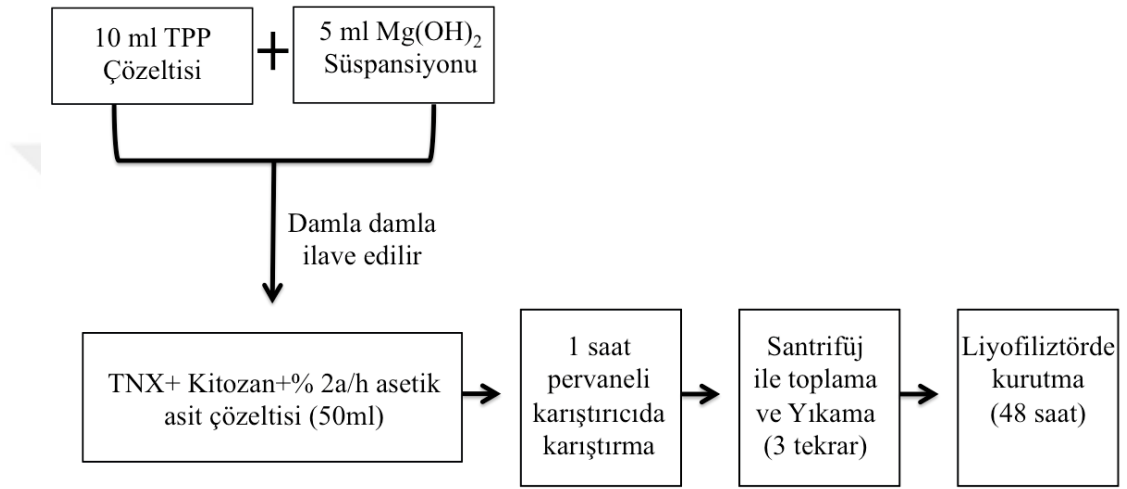
2.2. Önformülasyon Çalışmaları ve Formülasyonların Hazırlanması

Eklem içerisine uygulanan etkin madde salım sistemlerinin pratikte anlam taşıması için Bölüm 1.5.2.2.' de belirtildiği gibi partiküler sistemlerin etkin madde salım süresinin en az üç hafta aralıklarla enjeksiyona izin verecek şekilde uzun olması gerekmektedir. Ayrıca eklem içerisinde inflamasyonu minimum seviyede tetikleyecek özelliklere sahip olmalıdır. Bunun için partiküler sistemlerin küresel yapıda ve 5-10 μm boyutları arasında olması istenmektedir. Arzu edilen bu özellikleri sağlaması amacıyla kitozan ve PLGA polimerleri kullanılarak mikropartikül formülasyonları geliştirilmiştir. Ayrıca partiküler sistemlerde gözlenen burst etkisinin azaltılması, partiküllerin eklem bölgesinden hızlıca uzaklaştırılmasını engellemek amacıyla oda sıcaklığında enjeksiyona uygun olması nedeniyle termojel formülasyonları mikropartiküller ile kombinasyon halinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Kitozan ve PLGA mikropartikülleri ile mikropartikül/termojel kombinasyonlarına ait önformülasyon çalışmaları aşağıda yer almaktadır.

2.2.1. Kitozan Bazlı Mikropartikül Formülasyonları

H. Thakkar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma incelendiğinde hidrofobik bir etkin madde için yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip, 5-10 μm boyutlarında emülsiyon-kimyasal çapraz bağlanma yöntemi ile küresel mikropartiküllerin elde edildiği görülmüştür (2004). Önformülasyon çalışmaları bu literatür baz alınarak başlatılmıştır. Kitozan mikropartikül formülasyonlarının hazırlanışı şu şekildedir: Emülsiyon yapısında dış fazı % 5 a/a Span 80 içeren sıvı parafin oluşturur. 5 g Span 80, darası alınmış bir behere tartılır ve terazi üzerinde 100 g' a tamamlanır. Manyetik karıştırıcı üzerinde 300 rpm' de 2 saat karıştırılır. İç fazı ise; % 3 a/h kitozan ve % 2 a/h Tween 80 içeren % 2 h/h asetik asit çözeltisi oluşturmaktadır. 0,1 g kitozan tartılır ve bir gece öncesinden 8 ml % 2 h/h asetik asit çözeltisi içerisine konarak manyetik karıştırıcı üzerinde 300 rpm' de karıştırılır. Kitozan tamamen çözündükten sonra 0,2 g Tween 80 ve 0,1 g hassas olarak tartılmış tenoksikam eklenir ve manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırmaya devam edilir. Daha sonra elde edilen süspansiyon ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek hava kabarcıklarından arındırılır ve % 2 h/h asetik asit çözeltisi ile 10 ml' ye tamamlanır. Ardından, 300 rpm' de 1 saat karıştırılır ve tekrar ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilir. Kullanılacak stok çözeltiler hazırlandıktan sonra parafin çözeltisinden 60 ml alınır ve 1000 rpm' de palet

karıştırıcı ile karıştırılır. Kitozan-etkin madde süspansiyonundan 3 ml enjektöre alınır ve damla damla sıvı parafin üzerine eklenir. 10 dakika karıştırma işlemine devam edildikten sonra 3 ml % 25 h/h gluteraldehit çözeltisi azar azar ilave edilir ve 1000 rpm’ de 3 saat boyunca karıştırmaya devam edilir. Mikropartiküller elde edildikten sonra toplama ve yıkama işlemleri uygulanır. Tenoksikam ışıktan bozunduğu için tüm işlemler karanlık ortamda yapılır.



Şekil 2.1. İyonik jelasyon yöntemi ile kitozan mikropartiküllerin üretim diyagramı

Bu yöntem ile üretilen partiküllerde sıvı parafinden arındırma işlemi başarı ile gerçekleştirilemediği ve % 5’ in altında enkapsülasyon etkinliği elde edildiği için formülasyon değişimine gidilmiştir. Santana ve arkadaşlarının yapmış oldukları ve patentleştirdikleri çalışmada iyonik jelasyon yöntemi ile partiküller üretilmiştir (2008). Bu çalışmadan yola çıkarak öncelikle formülasyonlar üzerine pH’nın etkisi incelenmiş ve en uygun pH koşullarında TPP konsantrasyonu, karıştırma hızı ve kitozan miktarı gibi diğer parametreler değiştirilerek formülasyonlar geliştirilmiştir. Bu yöntem ile üretim Şekil 2.1’ de gösterildiği gibidir. Öncelikle hesaplı miktar kitozan 100 ml’ lik behere alınır. Üzerine 50 ml %2 a/h asetik asit çözeltisi eklenir ve manyetik karıştırıcıda gece boyu karıştırılır. Hazırlanan kitozan çözeltisine 100 mg etkin madde konur ve 1 saat karıştırılır. Başka bir beherde ise hesaplı miktar TPP 10 ml distile suya eklenir ve manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırılır. Son olarak bir beherde 60 mg Mg(OH)₂ , 10 ml distile suya eklenir ve manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırılır. Hazırlanan Mg(OH)₂ süspansiyonundan 5 ml alınarak TPP çözeltisine

Çizelge 2.1. Kitozan mikropartikül formülasyonları

Formülasyon Adı	Kitozan (%)	TNX (%)	TPP (%)	Mg(OH) ₂ (%)	rpm*	pH	
						Kitozan Çöz.	TPP Çöz.
CH1	0,2	0,2	0,75	0,6	800	2,09	10,60
CH2	0,2	0,2	0,75	-	800	3,11	8,85
CH3	0,2	0,2	0,75	0,6	800	3,37	10,78
CH4	0,2	0,2	0,75	0,6	800	4,11	10,45
CH5	0,2	0,2	0,75	0,6	800	5,11	10,59
CH6	0,2	0,2	1,00	0,6	400	3,37	10,78
CH7	0,2	0,2	1,00	0,6	600	3,37	10,78
CH8	0,2	0,2	1,00	0,6	800	3,37	10,78
CH9	0,2	0,2	0,50	0,6	800	3,37	10,78
CH10	0,2	0,2	0,25	0,6	800	3,37	10,78
CH11	0,3	0,2	0,75	0,6	800	3,37	10,78
CH12	0,4	0,2	0,75	0,6	800	3,37	10,78

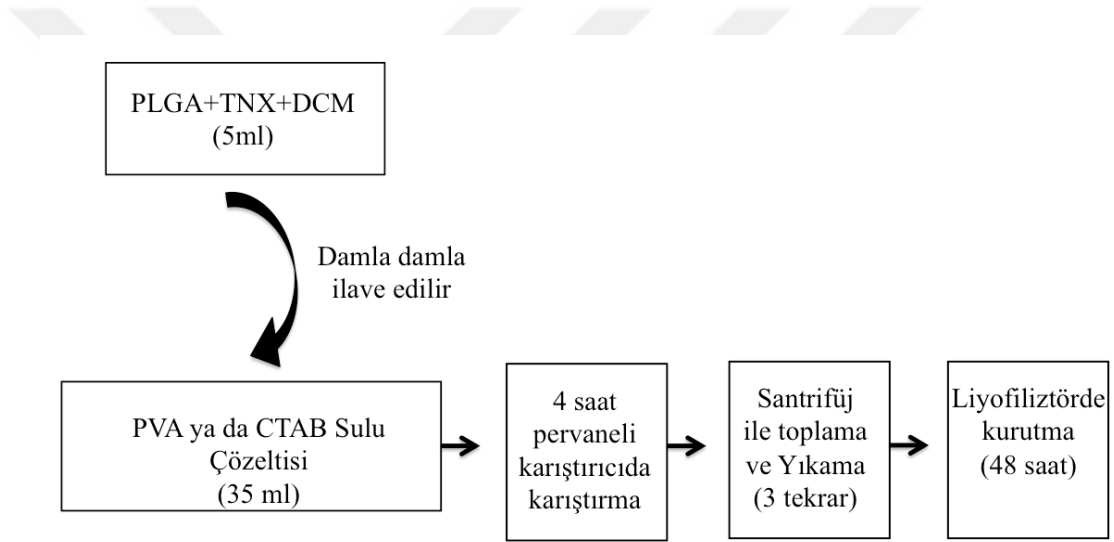
* Karıştırma hızı

eklenir. Mg(OH)₂ kullanılmayan formülasyonda TPP konsantrasyonunu değiştirmemek için 5 ml distile su eklenir. Hazırlanan karışımların pH' ları ölçülür. Kitozan-TNX karışımı pervaneli karıştırıcı ile karıştırılırken üzerine 10 ml TPP çözeltisi ve 5 ml % 0,6 Mg(OH)₂ süspansiyonu karışımı 1ml/dak hızında damla damla ilave edilir ve 1 saat süreyle karıştırma işlemine devam edilir. Daha sonra karışım 4000 rpm'de 15 dk süresince santrifüj edilir ve süpernatant kısımları atılarak santrifüj tüplerindeki mikropartiküllerin üzerine 7,5 ml' şer distile su konur ve vorteks yardımıyla resüspande edilir. Tekrar 4000 rpm' de 15 dk süresince santrifüj edilir. Bu işlem 3 defa tekrarlanır ve yıkanan partiküller 3 ml distile suda resüspande edilerek -20 °C' de dondurulur ve 48 saat boyunca liyofilizatörde kurutulur. İyonik jelasyon yöntemi ile üretilen kitozan mikropartikül formülasyonları Çizelge 2.1' de gösterilmektedir.

2.2.2. PLGA Bazlı Mikropartikül Formülasyonları

Hazırlanan kitozan mikropartiküllerinin partikül boyutlarının 30 µm üst sınırını aşması ve etkin madde çıkış hızları incelendiğinde arzu edilen uzun süreli salımı karşılayamaması gibi nedenlerden dolayı kitozana göre daha hidrofobik olan PLGA polimeri ile mikropartikül hazırlama seçeneği değerlendirilmiştir. Bölüm 1.5.5.2.' de değinildiği gibi hazırlama kolaylığı ve hidrofobik etkin maddeye uygunluğu açısından

emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak PLGA mikropartikülleri hazırlanmıştır. Formülasyon geliştirilirken stabilizan olarak PVA ve PVA' nın farklı konsantrasyonları kullanılarak farklı karıştırma hızları incelenmiş, sonrasında PLGA miktarı değiştirilerek formülasyon optimize edilmeye çalışılmıştır. PLGA miktarı ve karıştırma hızı belirlendikten sonra partiküllere pozitif yüzey yükü sağlamak amacıyla katyonik bir stabilizan olan ve PVA'ya göre daha küçük partikül oluşumunu sağlayan (Doolaanea ve ark., 2015; Fay ve ark., 2010; Shaikh ve ark., 2009) Hegzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB) seçilerek formülasyonlar geliştirilmiştir. Bu aşamada kullanılan CTAB konsantrasyonunun ve PLGA tipinin partikül büyüklüğü ve yüzey yükü üzerine etkisi incelenmiştir.



Şekil 2.2. Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile PLGA mikropartiküllerin üretim diyagramı

PLGA mikropartiküllerinin üretim prosesi Şekil 2.2' de verildiği gibidir. Hesaplı miktar PLGA ve tenoksikam 10 ml' lik bir behere alınır ve üzerine 5 ml DCM ilave edilir. Daha sonra ağzı kapalı bir şekilde 1 saat boyunca 300 rpm' de manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılır. Başka bir beherde ise hesaplı miktar PVA ya da CTAB 35 ml distile suda 1 saat boyunca 300 rpm' de ısıtmalı manyetik karıştırıcı üzerinde 60 °C' de karıştırılır. Hazırlanan sulu çözelti oda sıcaklığına indiğinde pervaneli karıştırıcıda karıştırmaya başlanır. Sonrasında bir pipet yardımıyla PLGA-TNX çözeltisi damla damla ilave edilerek karıştırmaya devam edilir. PLGA-TNX çözeltisi ilave edildikten sonra DCM' nin ortamdan uzaklaşması için 4 saat boyunca karıştırılır.

4 saatin sonunda sertleşen partiküller 15000 rpm’ de 15 dk santrifüjlenir ve süpernatant kısımları atılarak santrifüj tüplerindeki mikropartiküllerin üzerine 7,5 ml’ şer distile su konur ve vorteks yardımıyla resüspande edilir. Tekrar 15000 rpm’ de 15 dk süresince santrifüj edilir. Bu işlem 3 defa tekrarlanır ve yıkanan partiküller 3 ml distile suda resüspande edilerek -20 °C’ de dondurulur ve 48 saat boyunca liyofilizatörde kurutulur. Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen mikropartikül formülasyonları Çizelge 2.2’ de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. PLGA mikropartikül formülasyonları

Formülasyon Adı	PLGA (%*)	PLGA Tipi (L:G)	TNX (%*)	PVA (%*)	CTAB (%*)	Karıştırma Hızı (rpm)
P1	1	(50:50)	1	1	-	400
P2	1	(50:50)	1	1	-	800
P3	1	(50:50)	1	3	-	800
P4	1	(50:50)	1	5	-	800
P5	2	(50:50)	1	5	-	800
P6	3	(50:50)	1	5	-	800
P7	3	(50:50)	1	-	0,5	800
P8	3	(50:50)	1	-	1,0	800
P9	3	(50:50)	1	-	1,5	800
P10	3	(75:25)	1	-	0,5	800
P11	3	(75:25)	1	-	1,0	800
P12	3	(75:25)	1	-	1,5	800

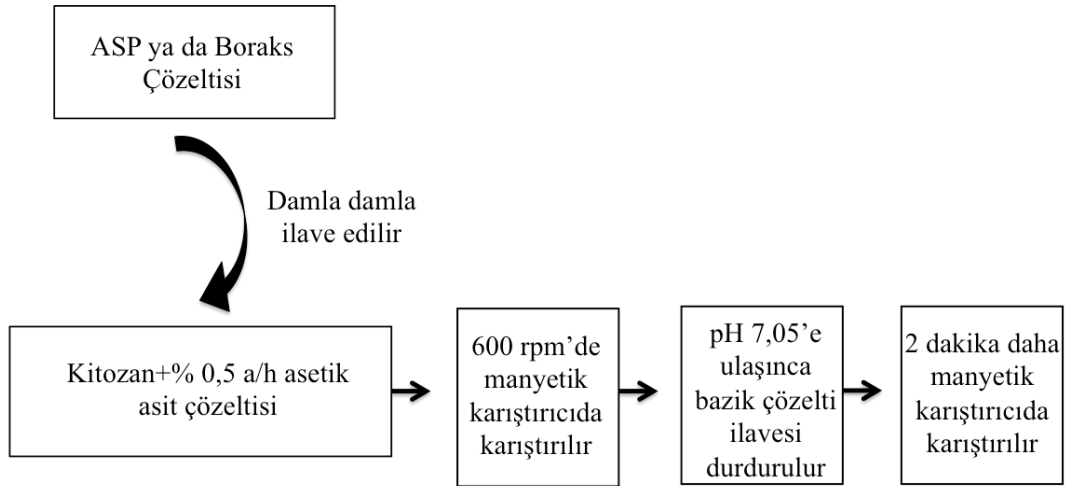
* % a/h konsantrasyon

2.2.3. Kitozan Bazlı Termojel Formülasyonları

İntraartiküler enjeksiyon için tasarlanan bir formülasyon ile etkin madde salım süresinin uzatılması amaçlanırken aynı zamanda partiküllerin eklem içinde kalış sürelerinin de artırılması gerekmektedir. Bu nedenle Bölüm 1.5.4.2.’ de değinildiği gibi polimerik partiküllerin termojeller ile birlikte eklem içine verilmesi gündeme gelmiştir. Bu amaçla hazırlanan kitozan ve PLGA mikropartikülleri ile birlikte eklem içine enjekte edilebilecek, oda sıcaklığında sıvı olan ve vücut sıcaklığında jelleşebilen kitozan termojel formülasyonları geliştirilmesi planlanmıştır. Kitozan termojel

Çizelge 2.3. Kitozan termojel formülasyonları

Formülasyon Adı	Kitozan			Zayıf Baz Çözeltisi ve Miktarı			Karışımın pH Değeri
	Molekül Ağırlığı	% a/h miktarı	pH	Adı	% a/h miktarı	pH	
T1	LMW	1,6	4,93	ASP	60	7,50	7,05
T2	MMW	1,6	4,94	ASP	60	7,50	7,05
T3	HMW	1,6	4,97	ASP	60	7,50	7,05
T4	MMW	1,6	4,94	ASP	45	8,08	7,05
T5	MMW	1,6	4,94	ASP	30	8,12	7,05
T6	MMW	1,6	4,94	ASP	15	8,11	7,05
T7	MMW	1,6	4,94	Boraks	3	9,05	7,05
T8	MMW	1,6	4,94	Boraks	2	9,03	7,05
T9	MMW	1,6	4,94	Boraks	1	9,02	7,05

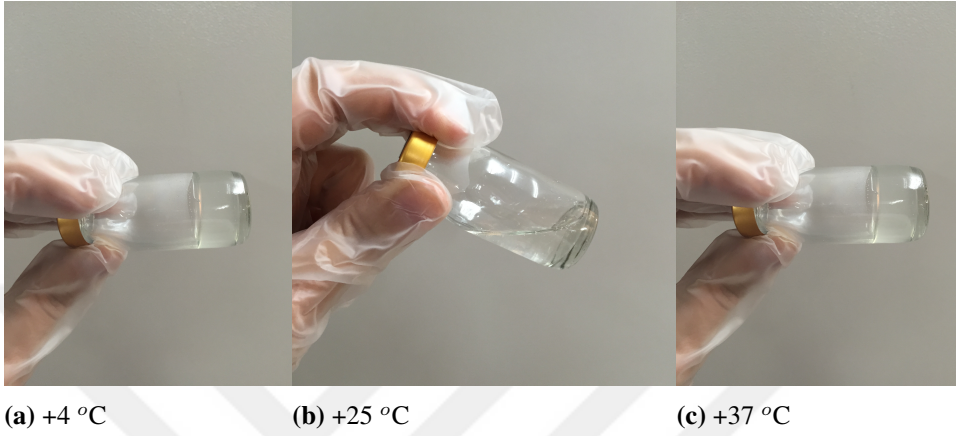


Şekil 2.3. Kitozan termojel üretim diyagramı

formülasyonları geliştirilirken ilk olarak hazırlanan örnek bir formülasyonun farklı sıcaklık değerlerindeki fiziksel özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla termojel formülasyonunun +4, +25 ve + 37 °C sıcaklıklarındaki fiziksel hali incelenmiş ve Şekil 2.4' de verildiği gibi termojelin +25 °C' de sıvı halde olduğu ancak +4 ve +37 °C sıcaklık değerlerinde jel yapısında olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç, hazırlayacağımız termojel formülasyonlarının +25 °C' de eklem içerisine enjeksiyona olanak sağlayacağını ve enjeksiyon sonrası vücut sıcaklığının etkisiyle jel yapısına geçeceğini düşündürmektedir.

Kitozan termojel formülasyonları, kitozanın asidik çözeltisine pK_a değeri kitozana yakın olan bir zayıf baz ilavesi ile hazırlanmıştır. Termojel formülasyonları hazırlanırken öncelikle hangi molekül ağırlığındaki kitozanın kullanılması gerektiğine karar vermek için bu parametre değiştirilerek formülasyonlar hazırlanmıştır. Sonrasında ise eklenen bazik ajanın türü ve miktarı değiştirilerek termojel özellikleri incelenmiştir. Formülasyonların üretim diyagramı Şekil 2.3' de gösterildiği gibidir. Öncelikle % 1,6 (a/h) konsantrasyonunda farklı molekül ağırlıklı kitozan çözeltileri hazırlanır. Bunun için kitozan % 0,5 (h/h) asetik asit çözeltisine eklenir ve gece boyunca manyetik karıştırıcıda 300 rpm' de karıştırılır. Daha sonra % 1-2-3 (a/h) boraks ve % 15-30-45-60 (a/h) amonyum sodyum fosfat (ASP) çözeltileri hazırlanır. Manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm' de karıştırılırken, zayıf baz çözeltileri kitozan çözeltisine damla damla eklenir. Kitozan çözeltisinin pH değeri 7,05' e ulaşınca bazik çözelti ilavesi sonlandırılır ve 2 dakika daha karıştırılmaya devam edilir. Termojel formülasyonları hazırlandıktan sonra 25 °C' de muhafaza edilir. Hazırlanan termojel

formülasyonları Çizelge 2.3’ de verilmiştir. En son aşamada hazırlanan termojel formülasyonları İA uygulama için daha önceden hazırlanan kitozan ve PLGA bazlı mikropartiküller ile oda sıcaklığında homojen olarak karıştırılırlar.



Şekil 2.4. Kitozan termojelinin farklı sıcaklık derecelerindeki sol-jel geçişi

2.3. Mikropartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

2.3.1. Mikropartiküllerin Üretim Veriminin Bulunması

Kitozan ve PLGA mikropartikülleri üretim proseslerinin son basamağı olan liyofilizasyon işleminden sonra hassas terazide tartılarak elde edilen ürün miktarı bulunmuş ve aşağıdaki formül ile % verim hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Verim (Kitozan Mikropart.)} = \frac{\text{Mikropartikül miktarı (mg)}}{\text{Kitozan+ TNX+ TPP miktarı (mg)}} \times 100 \quad (2.3)$$

$$\% \text{ Verim (PLGA Mikropart.)} = \frac{\text{Mikropartikül miktarı (mg)}}{\text{PLGA+ TNX miktarı (mg)}} \times 100 \quad (2.4)$$

2.3.2. Mikropartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Bulunması

Hazırlanan mikropartiküllerin içerdiği etkin madde miktarını bulmak için 5 mg mikropartikül 50 ml DCM ile 24 saat boyunca karıştırılır ve etkin maddenin diklorometana geçmesi sağlanır. Daha sonra eğer gerekli ise DCM ile gerekli seyreltmeler yapılarak 345,14 nm’ de UV spektrometresinde okunur. Her bir formülasyon için 3 paralel halinde çalışılmıştır. Formülasyon içindeki etkin madde miktarı tespit edildikten sonra aşağıda yer alan formül kullanılarak enkapsülasyon etkinlikleri (% EE) bulunur.

$$\% EE = \frac{\text{Mikropartikül içindeki TNX miktarı (mg)}}{\text{Formülasyonda kullanılan TNX miktarı (mg)}} \times 100 \quad (2.5)$$

2.3.3. Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının Bulunması

Liyofilize mikropartiküller, distile su içerisinde prob sonikatör ile 7 cycle, % 40 güçte 2 dakika boyunca sonike edilerek süspande edilir. Hazırlanan süspansiyonlar ölçüm kabına alınarak lazer ışık kırınımı yöntemine göre Malvern Mastersizer 3000 cihazı ile ölçülür. Ölçüm sonrasında partiküllere ait kümülatif partikül boyutu eğrisinde % 10’ a (d_{10}), % 50’ ye (d_{50}) ve % 90’ a (d_{90}) denk gelen partikül çapları bulunur. Partikül dağılımını belirleyebilmek için aşağıdaki formül kullanılarak Span değeri hesaplanır. Partikül boyutu ölçümü her numune için 3 defa yapılmıştır.

$$SPAN = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (2.6)$$

2.3.4. Mikropartiküllerin Yüzey Yüklerinin Bulunması

Liyofilize mikropartiküller, distile su içerisinde prob sonikatör ile 7 cycle, % 40 güçte 2 dakika boyunca sonike edilerek süspande edilir. Hazırlanan dilüe süspansiyonlar ölçüm küvetine alınarak PALS (Phase Analysis Light Scattering) yöntemi ile ölçüm yapan Malvern Zetasizer NanoZS ile ölçüm yapılarak yüzey yükleri belirlenmiştir. Her bir numune için beş defa ölçüm yapılmıştır.

2.4. Termojel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

2.4.1. Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin pH Değerinin Ölçülmesi

Kitozan termojel üretimi, asidik kitozan çözeltisinin nötralleştirilmesi esasına dayanmaktadır. Termojel üretim prosesinde kitozan çözeltisine ASP ve boraks çözeltileri, ortam pH değeri nötr (7,05) oluncaya kadar eklenmektedir. Bu nedenden dolayı termojel üretiminde pH kritik bir parametredir ve ölçüm yapılarak pH değerleri belirlenmelidir. Termojel üretimi için hazırlanan kitozan, ASP ve boraks çözeltilerinin ve formülasyonların pH değerleri 25°C’ de İnolab pH 720 set mit Schott N61 Elektrode ile ölçülerek elde edilmiştir.

2.4.2. Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin ve Formülasyonların Viskozite Değerlerinin Ölçülmesi

Vizkozite ölçümleri için Brookfield RV Digital Viscometer cihazı (spindle no: 92) kullanılmıştır. Ölçümler 25 °C’ de 10, 20, 50 ve 100 rpm dönü hızlarında % 1,6 (a/h) konsantrasyonunda farklı molekül ağırlıklı kitozan çözeltileri ve bu çözeltilere zayıf baz çözeltilerinin ilavesi ile elde edilen nötral kitozan çözeltileri için yapılmıştır. Her bir formülasyon için üç paralel analiz yapılmıştır

2.4.3. Termojel Formülasyonlarının Jelleşme Sürelerinin Bulunması

Hazırlanan nötral kitozan çözeltileri 4 °C, 25 °C ve 37 °C’ de bekletilerek sol-jel geçişinin olup olmadığı tespit edilir. Daha sonra vücut sıcaklığı olan 37 °C’ deki jelleşme süresinin belirlenmesi için kitozan termojellerin jelleşme sürelerinin tayini için 2 ml nötral kitozan çözeltisi 10 ml’ lik bir behere alınır ve içine manyetik balık konur. Daha sonra manyetik karıştırıcı üzerinde konulan 37 °C’ lik su banyosu içerisine bu beher yerleştirilir ve 100 rpm’ de karıştırmaya başlanır. Kronometre tutularak manyetik balığın yalpalamaya başladığı süre belirlenir. Her bir formülasyon için üç paralel analiz yapılmıştır.

2.4.4. Termojel Formülasyonlarının Enjekte Edilebilirliğinin Belirlenmesi

Enjekte edilebilirlik tayini Schuetz ve arkadaşlarının yapmış olduğu test yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır (2008). Enjekte edilebilirlik için 5 ml’ lik bir enjektöre iğnesi (23G, 25mm) takılır ve 25 °C’ deki 1 ml nötral kitozan çözeltilerinden konulur. Enjektör dikey bir şekilde tutacak aracılığı ile sabitlenir ve üzerine 1 kg’lık ağırlık konulur. Kronometre ile 1 ml kitozan çözeltisinin ne kadar sürede enjektörden tamamen boşaldığı tespit edilir. Her bir formülasyon için üç paralel tayin yapılmıştır.

2.5. Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Hazırlanan kitozan mikropartiküller, PLGA mikropartikülleri ve kitozan termojelleri, ve mikropartikül/termojel kombinasyonlarından seçilen formülasyonlar morfolojik inceleme amacıyla taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Formülasyonlar liyofilize edildikten sonra plakalara yerleştirilmiş ve ardından altın kaplama yapılmıştır. Kaplanan formülasyonlar Zeiss Evo LS 10 taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir.

2.6. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetresi (DSC) ile Analizi

Mikropartikül ve termojel formülasyonlarının termal analizleri için formülasyon tasarımlarında incelenen her bir parametreyi değerlendirecek şekilde her formülasyon grubunda yer alan örneklerin ve bu formülasyonların hazırlanmasında kullanılan bütün yardımcı maddelerin DSC analizi yapılmıştır. Analiz için hassas olarak tartılan 2 mg liyofilize numune alüminyum kapsüllere konulmuştur. Hazırlanan kapsüller preslenerek cihaza yerleştirilmiş ve 20-400 °C aralığında 10 °C/dak hızda termogramlar elde edilmiştir.

2.7. Formülasyonların Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile Analizi

Çalışmamızda mikropartikül ve termojel formülasyonları içinden incelenen formülasyon parametrelerini yansıtan liyofilize formülasyonlar seçilerek Bölüm 2.1.3.7.' de belirtilen şekilde FTIR spektrumları alınmıştır.

2.8. Formülasyonlardan Etkin Madde Çıkış Profillerinin İncelenmesi

Mikropartikül ve mikropartikül/termojel kombinasyonlarından tenoksikamın in vitro salım deneyi diyaliz membran yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Formülasyonların etkin madde çıkış profillerinin incelenmesi için hesaplı miktar mikropartikül 2 ml PBS 7,4 tamponunda prob sonikatör ile 7 cycle, % 40 güçte 2 dakika boyunca sonike edilerek disperse edilir. Disperse partiküller önceden hidralize edilmiş dializ torbaya (MA:12000 Da) konularak iki ucu klips ile kapatılır. Diyaliz torba 98 ml PBS 7,4 tamponuna daldırılarak 37 °C' de yatay karıştırıcıda 50 rpm' de karıştırılır. Önceden belirlenmiş aralıklarda çözünme ortamlarından 5' er ml örnek alınır ve yerine taze 5 ml PBS 7,4 tamponu konur. Alınan örnekler UV spektrofotometre ile 367,97 nm' de ölçülür. Çözünme hızı deneyinde in vivo koşulları taklit etmek için önemli bir parametre olan sink koşulun sağlanması için gerekli hesaplar yapılarak çalışma ortamı 100 ml olarak belirlenmiş ve her ölçüm sonrasında ortam hacminin değişmemesi için alınan 5 ml numunenin yerine 5 ml taze tampon çözeltisi ortama ilave edilmiştir. Her bir numune için üç paralel halinde çalışılmıştır.

2.9. Formülasyonların Etkin Madde Çıkış Kinetiklerinin İncelenmesi

Mikropartikül ve mikropartikül/termojel kombinasyonlarından salım hızı çalışması yapılarak birim zamanda açığa çıkan etkin madde miktarının belirlenmesiyle çözünme hızı profilleri elde edilmiştir. Etkin madde salım profillerinin hangi matematiksel modelle uyum sağladığını belirlemek için sıfır derece, birinci derece, Hixson-Crowell, Higuchi ve Korsmeyer Peppas kinetik modelleri uygulanmış, elde edilen bulgular IBM SPSS 22.0.0.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2.10. Formülasyonların Ön Stabilite İncelemesi

Hazırlanan mikropartiküllerin karanlık ortam koşullarında 25 °C’de % 60 bağıl nem içeren, 40 °C’ de % 75 bağıl nem içeren ve 4 °C’ de buzdolabı ortamlarındaki üç aylık stabilitesi incelenmiştir. Formülasyonların birinci ve üçünü ay sonundaki partikül büyüklük ve dağılımı ile zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak mikropartiküller üzerindeki değişimler incelenmiştir.

2.11. İstatistiksel Değerlendirme

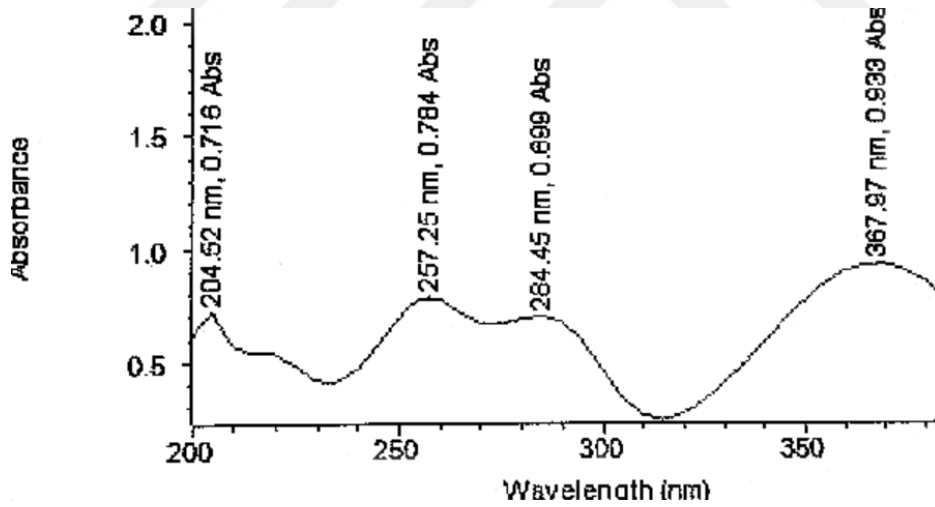
Tez çalışması sırasında yapılan deneysel verilerin değerlendirilmesinde çeşitli istatistiksel analiz yöntemleri kullanılmıştır. Analiz yönteminin validasyon çalışmasında en küçük kareler yöntemi kullanılmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin değerlendirilmesinde One-Way ANOVA testi (IBM SPSS 22.0) kullanılmıştır. Formülasyonların karakteristik özelliklerinin değerlendirilmesinde ve grupların ikili karşılaştırılmasında Tukey’s Post Hoc testi ve Paired Sample T analizleri kullanılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen p değeri 0,05’ten küçük ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

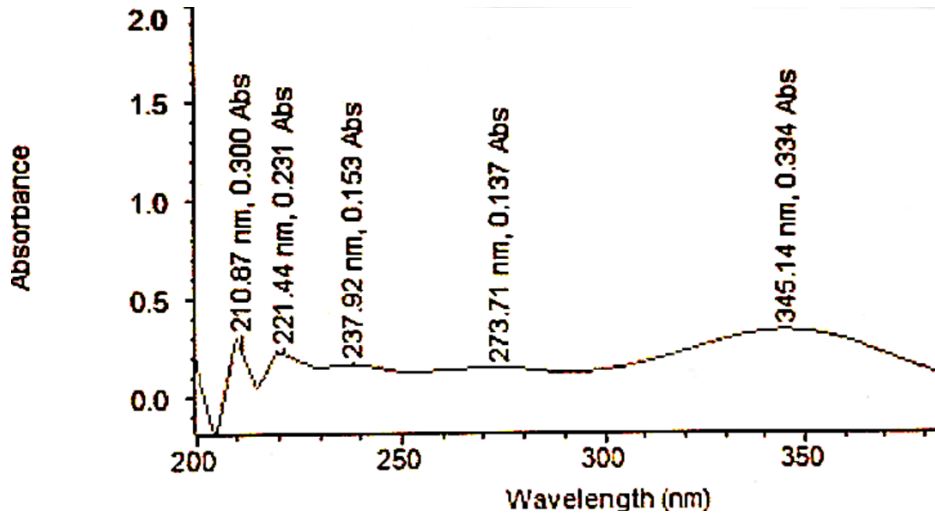
3.1. Tenoksikamın Özelliklerine Ait Bulgular

3.1.1. Tenoksikamın UV Spektrumu

Etkin maddenin PBS 7,4 tamponu ve DCM’ deki çözeltilerinin spektrumları Bölüm 2.1.3.2.’ de anlatıldığı gibi alınmış ve etkin maddenin PBS 7,4’ de maksimum absorbans gösterdiği pik Şekil 3.1’ de gösterildiği gibi 367,97 nm ve DCM’ de maksimum absorbans gösterdiği pik Şekil 3.2’ de gösterildiği gibi 345,14 nm olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Tenoksikamın PBS 7,4 ortamındaki UV spektrumu



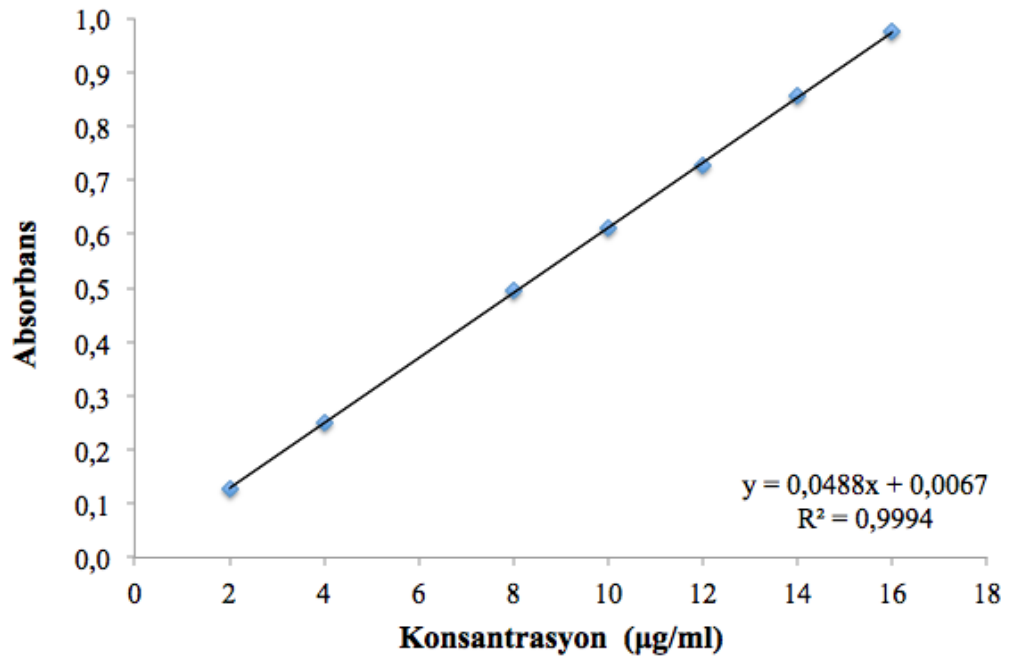
Şekil 3.2. Tenoksikamın DCM ortamındaki UV spektrumu

3.1.2. Tenoksikamın Kalibrasyon Doğrusu

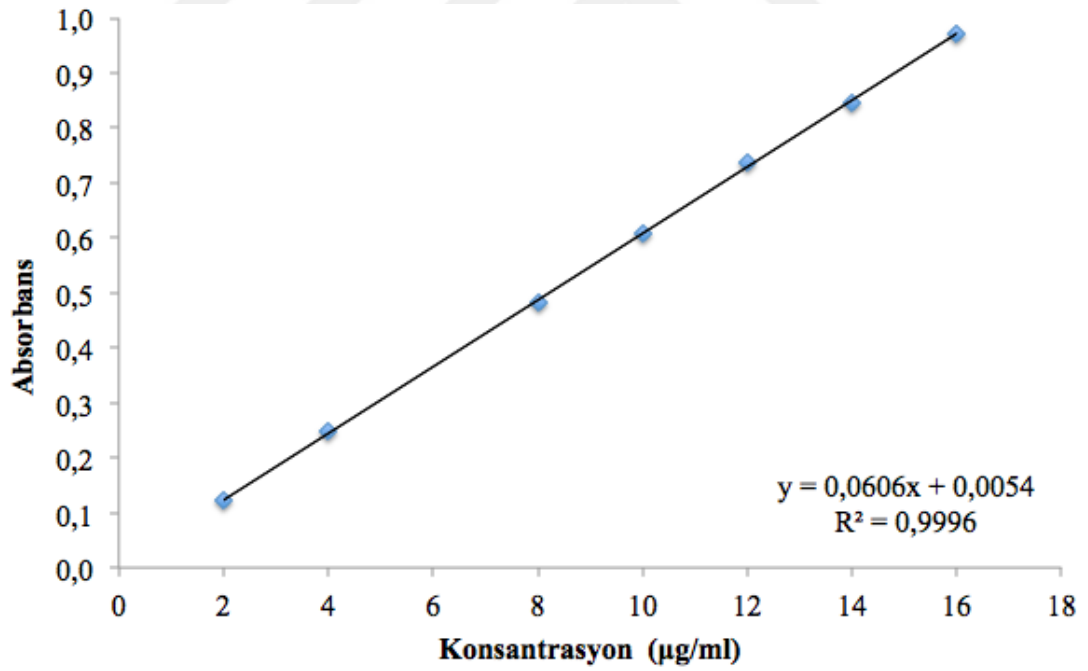
Etkin maddenin diklorometan ve PBS 7,4 tamponu ile hazırlanan çözeltilerine ait kalibrasyon denklemleri Bölüm 2.1.3.3.'de anlatıldığı gibi elde edilmiştir ve kalibrasyon doğrularına ait bulgular Çizelge 3.1 ve Şekil 3.3 ve 3.4' de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.1. Tenoksikamın farklı ortamlardaki kalibrasyon denklemlerine ait verileri

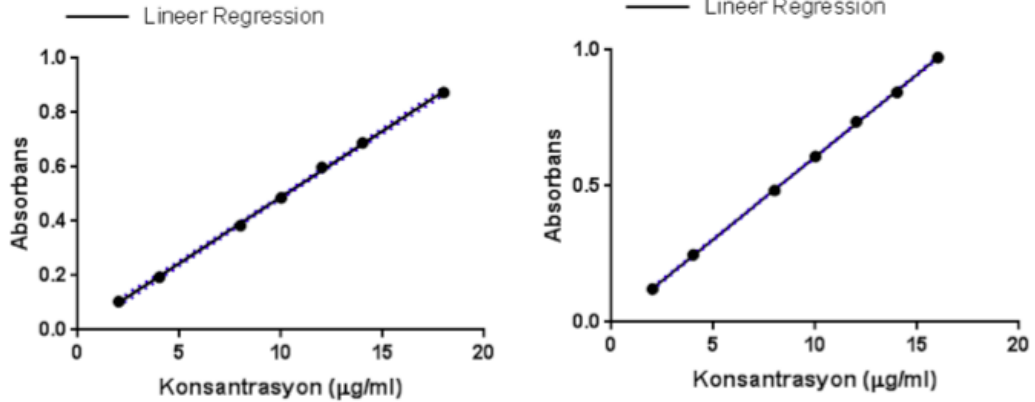
Çalışma Ortamı	PBS 7,4	DCM
Eğim	0,0488	0,0606
Kesişim	0,0067	0,0054
Doğru Denklemi	$y = 0,0488x - 0,0067$	$y = 0,0606x + 0,0054$
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,9994	0,9996



Şekil 3.3. Tenoksikamın PBS 7,4 ortamındaki kalibrasyon denklemi



Şekil 3.4. Tenoksikamın DCM ortamındaki kalibrasyon denklemi



(a) PBS 7,4

(b) DCM

Şekil 3.5. Tenoksikamın PBS 7,4 ve DCM ortamlarına ait % 95 güven sınırlarındaki kalibrasyon doğruları

3.1.3. Tenoksikama Ait Kalibrasyon Doğrularının Analitik Validasyonuna Ait Bulgular

Tenoksikamın PBS 7,4 tamponu ve DCM ortamları için geliştirilen miktar tayini yönteminin validasyonu Bölüm 2.1.3.4.'de anlatıldığı gibi yapılmış ve elde edilen bulgular başlıklar halinde verilmiştir.

Doğrusallık ve Aralığı

Etkin maddenin PBS 7,4 tamponu ve DCM ile hazırlanan çözeltilerine ait miktar tayini yönteminin doğrusallık ve aralığı çalışmasından elde edilen doğru Şekil 3.5' de ve bu doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Doğruluk ve Geri Elde

Etkin maddenin PBS 7,4 tamponu ve DCM ile hazırlanan çözeltilerine ait miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin çalışmalar sonucunda elde edilen değerler ile bu değerlere ait parametreler Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Kesinlik

Tenoksikamın PBS 7.4 tamponu ve DCM ile hazırlanan çözeltilerine ait kalibrasyonunun kesinliğinin saptanmasında tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik basamakları incelenmiştir.

Çizelge 3.2. Tenoksikamın PBS 7,4 ve DCM ortamlarındaki kalibrasyon doğrusuna ait parametreler

Parametreler	Ortam	
	PBS 7,4	DCM
Eğim (m) m±GS*	0,0488 ± 0,0005	0,0606 ± 0,0004
Kesişim (n) m±GS*	0,0067 ± 0,0032	0,0054 ± 0,0036
Determinasyon Katsayısı (r ²)	0,9994	0,9996
Regresyon Doğrusundan Sapmaların Standart Hatası (Sy.x)	0,0078	0,0048
Lineer Regresyon Kareler Toplamı	0,5792	0,4325
Artık Kareler Toplamı	0,5823	0,4336
Ortalamanın Artık Kareler Toplamı	0,5825	0,4345

* Güven Sınırları

Çizelge 3.3. Tenoksikamın PBS 7,4 tamponu ve DCM ortamlarındaki doğruluk ve geri elde değerleri

	Teorik Konsantrasyon (C (µg/ml))		
	2	10	18
Geri elde (%)	100,370	97,170	100,346
(PBS 7,4)	100,370	97,580	100,802
	101,390	97,580	100,460
	101,390	98,196	100,118
	101,390	97,991	101,258
	102,420	97,991	100,232
ORT	101,222	97,751	100,536
SS	0,771	0,376	0,424
RSD (%)	0,762	0,385	0,422
	Teorik Konsantrasyon (C (µg/ml))		
	2	10	16
Geri Elde (%)	100,330	100,099	99,691
(DCM)	101,155	100,099	99,691
	101,155	100,099	99,897
	101,155	100,099	99,897
	101,980	99,769	100,103
	101,980	99,934	100,103
ORT	101,293	100,017	99,897
SD	0,621	0,138	0,184
RSD (%)	0,613	0,138	0,185

- Tekrarlanabilirlik

Tenoksikamın PBS 7.4 tamponu ve DCM ile hazırlanan çözeltilerine ait bulgular ve istatistiki bilgiler Çizelge 3.4 ve 3.5’ de verilmiştir.

Çizelge 3.4. PBS 7,4 için tekrarlanabilirlik verileri

Teorik Konsantrasyon						
2µg/ml		10 µg/ml		18µg/ml		
ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)	
0,090	2,007	0,482	10,045	0,853	17,652	
0,090	2,007	0,482	10,045	0,855	17,693	
0,090	2,007	0,483	10,066	0,854	17,673	
0,091	2,028	0,485	10,107	0,856	17,714	
0,091	2,028	0,483	10,066	0,856	17,714	
0,092	2,048	0,484	10,086	0,854	17,673	
ORT	2,021		10,069		17,686	
SS	0,017		0,024		0,019	
RSD (%)	0,828		0,238		0,105	

Çizelge 3.5. DCM için tekrarlanabilirlik verileri

Teorik Konsantrasyon						
2µg/ml		10 µg/ml		16µg/ml		
ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)	
0,121	1,908	0,600	9,812	0,963	15,802	
0,121	1,908	0,600	9,812	0,965	15,835	
0,121	1,908	0,601	9,828	0,963	15,802	
0,119	1,875	0,603	9,861	0,963	15,802	
0,121	1,908	0,603	9,861	0,967	15,868	
0,118	1,858	0,603	9,861	0,967	15,868	
ORT	1,894		9,839		15,829	
SS	0,022		0,025		0,032	
RSD (%)	1,158		0,252		0,205	

- Ara Kesinlik

Etkin maddenin PBS 7.4 tamponu ve DCM ile hazırlanan çözeltilerinin farklı günlere ait bulguları ve istatistiki bilgileri Çizelge 3.6 ve 3.7’ de verilmiştir.

ΓSeçicilik

Seçicilik testi için formülasyonda kullanılan maddelerin tek başına ve etkin madde ile birlikte DCM ve PBS 7.4’de hazırlanan karışımlarının UV spektrofotometresinde ölçümleri yapılmış ve herhangi bir çakışma gözlenmemiştir.

Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Tenoksikamın DCM ve PBS 7.4 ortamlarındaki miktar tayin yöntemlerine ilişkin hesaplanan LOD ve LOQ değerleri Çizelge 3.8’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. Tenoksikamın farklı ortamlara ait teşhis ve tayin sınırları

ORTAM	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
DCM	0,378	1,146
PBS 7.4	0,626	1,896

3.1.4. Tenoksikamın Çözünme Ortamındaki Kısa Süreli Stabilité İncelemesine Ait Bulgular

Tenoksikamın PBS 7,4 tamponu içindeki kısa süreli stabilite çalışmaları Bölüm 2.1.3.5.’ de anlatıldığı gibi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9’ de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Tenoksikamın PBS 7,4 tamponundaki ara kesinlik incelemesine ait bulguları

	Teorik Konsantrasyon					
	2 μ g/ml		10 μ g/ml		18 μ g/ml	
1. GÜN	ABS	C (μ g/ml)	ABS	C (μ g/ml)	ABS	C (μ g/ml)
	0,090	2,007	0,476	9,922	0,878	18,165
	0,090	2,007	0,478	9,963	0,877	18,144
	0,091	2,028	0,478	9,963	0,878	18,165
	0,091	2,028	0,481	10,025	0,879	18,185
	0,091	2,028	0,480	10,04	0,881	18,226
	0,092	2,048	0,480	10,004	0,879	18,185
ORT		2,024		9,980		18,179
SS		0,015		0,038		0,028
RSD (%)		0,762		0,377		0,154
2. GÜN	ABS	C (μ g/ml)	ABS	C (μ g/ml)	ABS	C (μ g/ml)
	0,090	2,007	0,482	10,045	0,883	18,267
	0,090	2,007	0,482	10,045	0,885	18,308
	0,090	2,07	0,483	10,066	0,884	18,288
	0,091	2,028	0,485	10,107	0,882	18,247
	0,091	2,028	0,483	10,066	0,882	18,247
	0,092	2,048	0,484	10,086	0,884	18,288
ORT		2,021		10,069		18,274
SS		0,017		0,024		0,025
RSD (%)		0,828		0,238		0,136
3. GÜN	ABS	C (μ g/ml)	ABS	C (μ g/ml)	ABS	C (μ g/ml)
	0,091	2,028	0,477	9,943	0,879	18,185
	0,092	2,048	0,477	9,943	0,879	18,185
	0,092	2,048	0,479	9,984	0,882	18,247
	0,093	2,069	0,481	10,025	0,880	18,206
	0,093	2,069	0,482	10,045	0,883	18,267
	0,093	2,069	0,483	10,066	0,884	18,288
ORT		2,055		10,001		18,230
SS		0,017		0,053		0,044
RSD (%)		0,815		0,525		0,240
C (μg/ml) (Teorik)	2,000	10,000	18,000			
C (μg/ml)(ORT)	2,034	10,017	18,228			
ORT. SS	0,016	0,038	0,032			
ORT. RSD (%)	0,802	0,380	0,177			

Çizelge 3.7. Tenoksikamın DCM içindeki ara kesinlik incelemesine ait bulguları

	Teorik Konsantrasyon					
	2 µg/ml		10 µg/ml		16 µg/ml	
1. GÜN	ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)
	0,121	1,908	0,610	09,977	0,980	16,083
	0,121	1,908	0,609	09,960	0,978	16,050
	0,121	1,908	0,610	09,977	0,977	16,033
	0,119	1,875	0,613	10,026	0,981	16,099
	0,121	1,908	0,611	09,993	0,977	16,033
	0,118	1,858	0,612	10,010	0,980	16,083
ORT		1,894		09,991		16,063
SS		0,022		0,024		0,028
RSD (%)		1,158		0,243		0,177
2. GÜN	ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)
	0,124	1,957	0,613	10,026	0,979	16,066
	0,125	1,974	0,613	10,026	0,979	16,066
	0,126	1,990	0,614	10,043	0,978	16,050
	0,126	1,990	0,612	10,010	0,977	16,033
	0,128	2,023	0,610	9,977	0,980	16,083
	0,128	2,023	0,614	10,043	0,981	1,099
ORT		1,993		10,021		16,066
SS		0,026		0,025		0,023
RSD (%)		1,327		0,248		0,145
3. GÜN	ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)	ABS	C (µg/ml)
	0,127	2,007	0,612	10,010	0,976	16,017
	0,128	2,023	0,612	10,010	0,977	16,033
	0,128	2,023	0,612	10,010	0,974	15,983
	0,128	2,023	0,612	10,010	0,974	15,983
	0,129	2,040	0,610	9,977	0,979	16,066
	0,129	2,040	0,611	9,993	0,980	16,083
ORT		2,026		10,002		16,028
SS		0,012		0,014		0,041
RSD (%)		0,613		0,138		0,258
C (µg/ml) (Teorik)	2,000	10,000	16,000			
C (µg/ml) (ORT)	1,971	10,004	16,052			
SS	0,020	0,021	0,031			
RSD (%)	1,033	0,210	0,193			

Çizelge 3.9. Tenoksikamın PBS 7,4 tamponundaki kısa süreli stabilite incelemesine ait bulgular

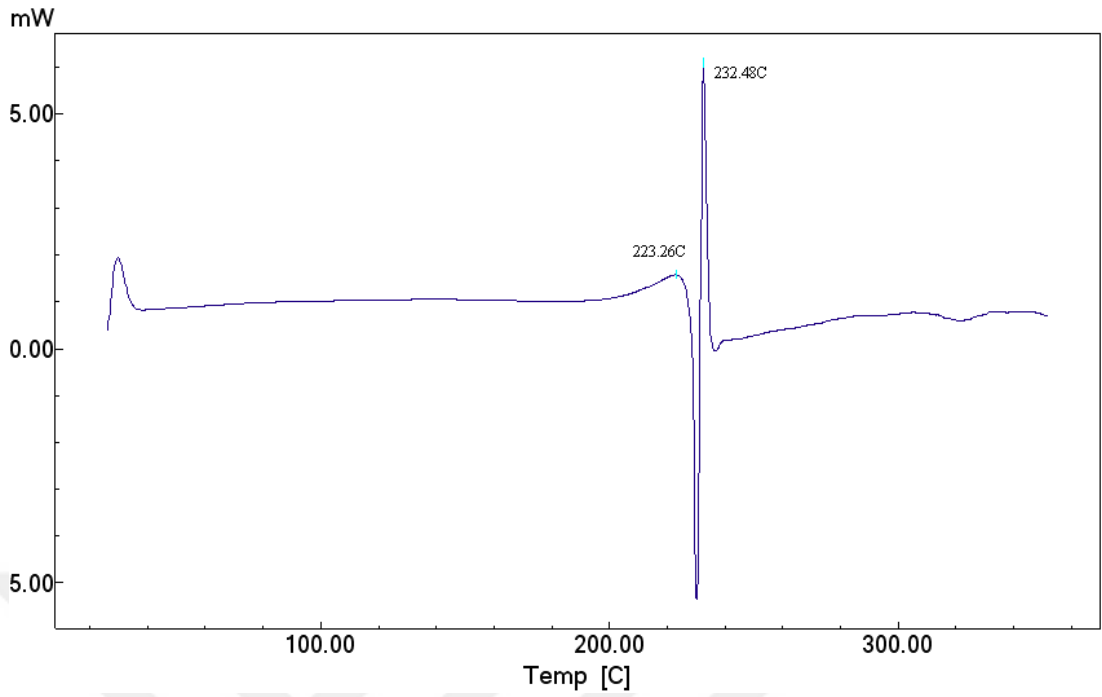
Zaman (saat)		0	24	48	Ortalama	SS	% RSD
Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	2	1,998	1,997	1,996	1,997	0,001	0,050
	10	10,001	10,003	10,002	10,002	0,001	0,010
	18	18,005	18,002	18,003	18,003	0,002	0,008

3.1.5. Tenoksikamın Diferansiyel Taramalı Kalorimetresi (DSC) ile Analizine Ait Bulgular

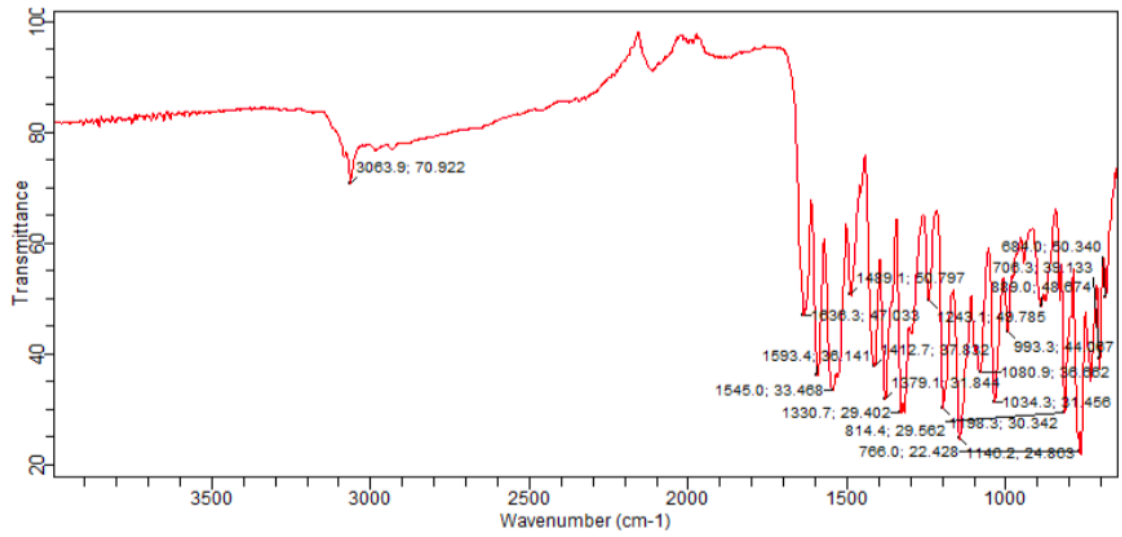
Tenoksikamın termal davranışını tanımlamak amacıyla Bölüm 2.1.3.6’ da açıklanan şekilde DSC analizi yapılmış ve elde edilen termogram Şekil 3.6’ da yer almaktadır.

3.1.6. Tenoksikamın Fourier Dönüştürümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) İle Analizine Ait Bulgular

Tenoksikamın Bölüm 2.1.3.7’ de belirtilen şekilde çalışılarak elde edilen FTIR spektrumu Şekil 3.7’ de görülmektedir.



Şekil 3.6. Tenoksikama ait DSC termogramı



Şekil 3.7. Tenoksikama ait FTIR spektrumu

3.1.7. Tenoksikamın Çalışma Ortamlarındaki Çözünürlüğüne Ait Bulgular

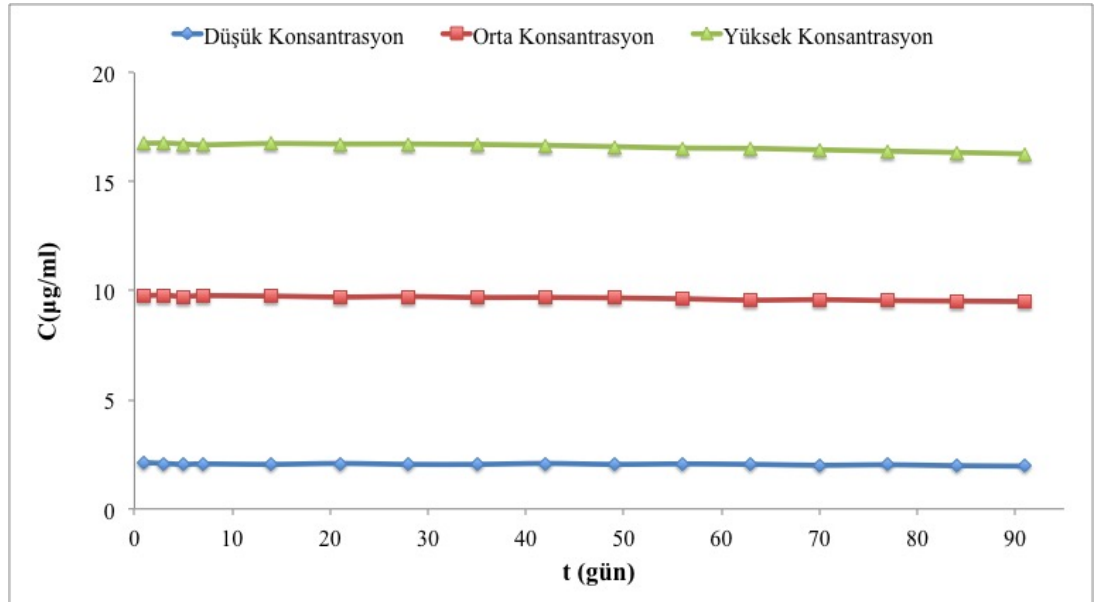
Tenoksikamın 25 °C’ de PBS 7,4 ve DCM ortamlarındaki çözünürlük değerlerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 2.1.3.8.’ de açıklanan şekilde gerçekleştirilen üç paralel tayin sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 3.10’ da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Tenoksikamın farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri

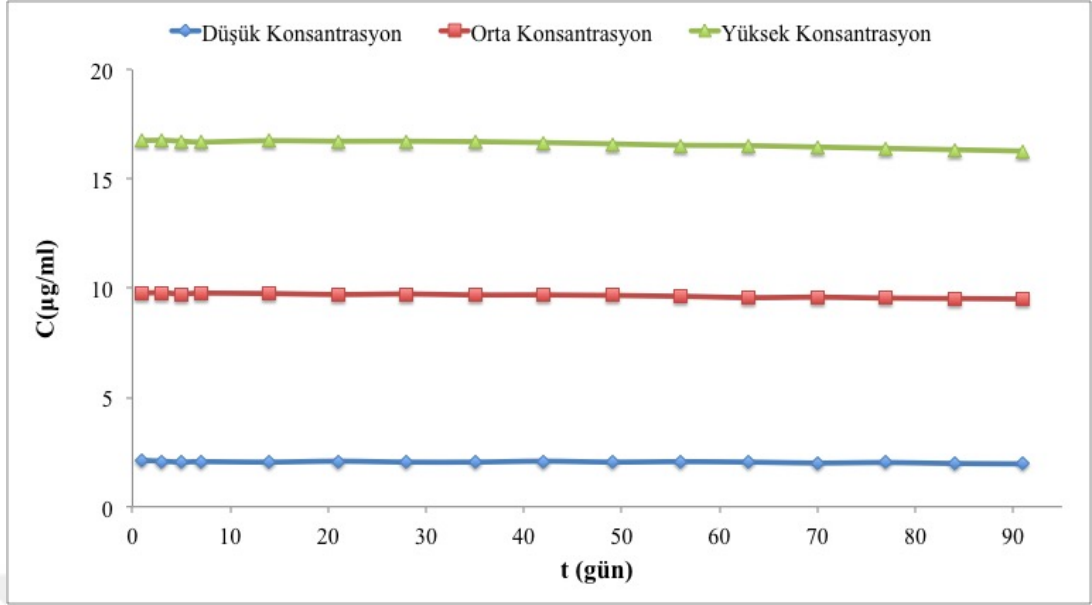
Ortam	Çözünürlük değeri (mg/ml)	Standart Hata ($\pm$)
PBS 7,4	1,258	0,036
DCM	524,090	0,024

3.1.8. Tenoksikamın Stabilesine Ait Bulgular

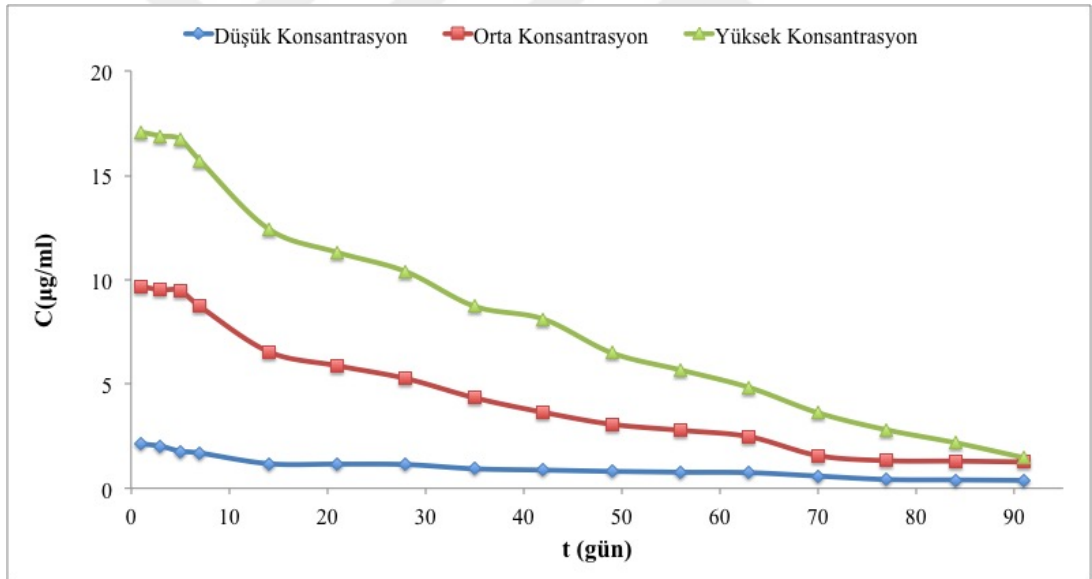
Bölüm 2.1.3.9’ da anlatılan şekilde gerçekleştirilen ölçümler sonucu tenoksikamın üç aylık stabilite bulguları Şekil 3.8, 3.9, 3.10 ve 3.11’ de verilmiştir.



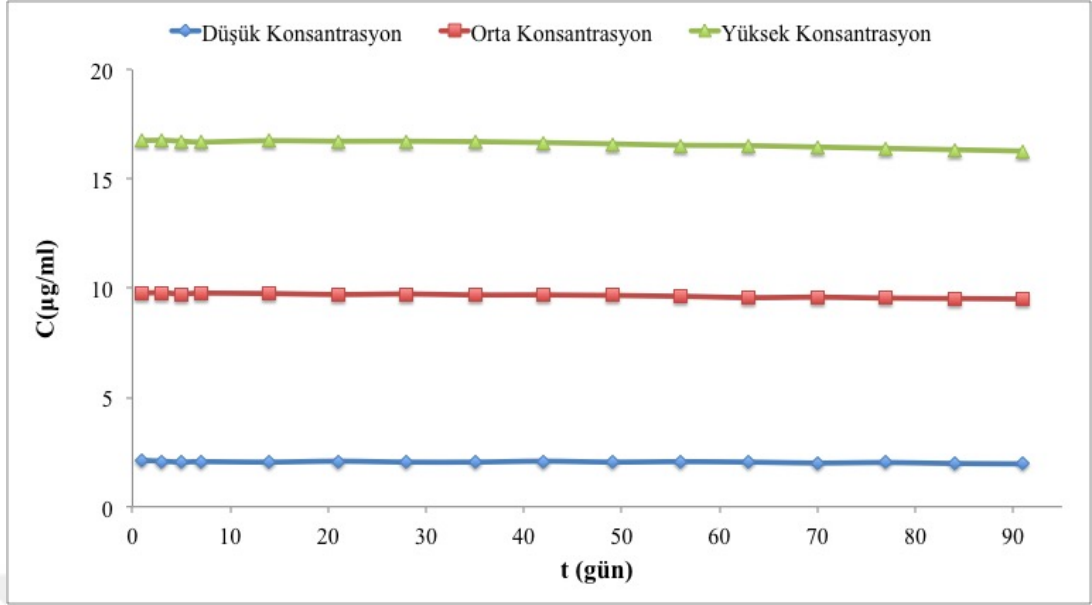
Şekil 3.8. +4 °C buzdolabındaki stabilitesi



Şekil 3.9. +25 °C % 60 bağıl nem ve karanlık ortamdaki stabilitesi



Şekil 3.10. +25 °C % 60 bağıl nem ve aydınlık ortamdaki stabilitesi



Şekil 3.11. +40 °C %70 bağıl nem ve karanlık ortamdaki stabilitesi

3.2. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

3.2.1. Mikropartiküllerin Üretim Verimlerine Ait Bulgular

Hazırlanan çeşitli mikropartikül formülasyonlarında yapılan kontrollerin başında gelen ve Bölüm 2.3.1.’ de belirtildiği gibi hesaplanan % ürün verimine ait bulgular Çizelge 3.11’ de yer almaktadır.

3.2.2. Mikropartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliklerine Ait Bulgular

Hazırlanan kitozan ve PLGA mikropartiküllerinin enkapsülasyon etkinliklerine ait değerler Bölüm 2.3.2.’ de belirtilen şekilde hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.12’ de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Mikropartikül formülasyonlarına ait üretim verim değerleri

Formülasyon Adı	Verim (%)	Formülasyon Adı	Verim (%)
CH1	33,52	P1	58,71
CH2	65,89	P2	54,91
CH3	62,43	P3	53,55
CH4	51,67	P4	51,60
CH5	54,78	P5	52,06
CH6	62,36	P6	64,58
CH7	62,62	P7	40,02
CH8	62,43	P8	60,12
CH9	44,10	P9	41,17
CH10	- *	P10	49,53
CH11	41,33	P11	44,06
CH12	42,90	P12	29,99

*Mikropartikül elde edilemedi

Çizelge 3.12. Mikropartikül formülasyonlarına ait enkapsülasyon etkinliği değerleri

Formülasyon Adı	Enkapsülasyon Etkinliği (% ORT±SS, n=3)	Formülasyon Adı	Enkapsülasyon Etkinliği (% ORT±SS, n=3)
CH1	42,14±3,01	P1	87,41±3,63
CH2	77,87±3,56	P2	73,03±2,87
CH3	72,15±5,01	P3	57,91±2,23
CH4	54,05±5,00	P4	50,60±2,77
CH5	57,32±4,51	P5	47,40±1,51
CH6	72,18±5,01	P6	50,13±1,95
CH7	78,54±3,50	P7	56,83±1,80
CH8	78,19±4,01	P8	32,90±2,97
CH9	62,62±5,12	P9	28,18±2,22
CH10	- *	P10	42,94±2,95
CH11	48,85±4,54	P11	25,36±1,95
CH12	59,43±4,50	P12	15,48±1,38

*Mikropartikül elde edilemedi

3.2.3. Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Hazırlanan mikropartikül formülasyonlarının tamamı için partikül büyüklüğü analizi Bölüm 2.3.3.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Kitozan ve PLGA mikropartiküllerine ait ortalama partikül büyüklükleri ve partikül büyüklüğü dağılımını ifade eden SPAN değerleri Çizelge 3.13' de verilmiştir.

Çizelge 3.13. Mikropartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri ve dağılımına ait bulgular

Formülasyon Adı	Partikül Boyutu ($\mu\text{m} \pm \text{SS}, n=3$)	SPAN	Formülasyon Adı	Partikül Boyutu ($\mu\text{m} \pm \text{SS}, n=3$)	SPAN
CH1	74,60 $\pm$ 8,67	2,52	P1	84,70 $\pm$ 0,95	1,15
CH2	99,97 $\pm$ 0,25	2,32	P2	17,83 $\pm$ 0,47	1,11
CH3	59,57 $\pm$ 3,15	2,07	P3	13,40 $\pm$ 0,10	1,42
CH4	81,13 $\pm$ 1,66	2,17	P4	09,27 $\pm$ 0,11	1,73
CH5	183,7 $\pm$ 15,5	3,15	P5	11,43 $\pm$ 0,15	1,44
CH6	54,67 $\pm$ 2,52	3,52	P6	14,73 $\pm$ 0,74	2,06
CH7	59,17 $\pm$ 2,80	2,48	P7	31,43 $\pm$ 1,53	4,85
CH8	49,50 $\pm$ 1,51	2,38	P8	12,37 $\pm$ 0,40	2,96
CH9	64,83 $\pm$ 4,39	5,12	P9	32,70 $\pm$ 0,96	2,45
CH10	- *	- *	P10	71,67 $\pm$ 1,53	3,06
CH11	85,57 $\pm$ 11,56	5,14	P11	12,13 $\pm$ 0,21	2,29
CH12	106,67 $\pm$ 4,04	3,40	P12	92,33 $\pm$ 2,52	3,23

* Mikropartikül elde edilemedi

3.2.4. Mikropartiküllerin Yüzey Yüklerine Ait Bulgular

Hazırlanan Kitozan ve PLGA mikropartikülleri için zeta potansiyeli analizi Bölüm 2.3.4.' de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir mikropartikül formülasyonu için ele edilen ortalama zeta potansiyel değerleri standart sapma değerleri ile birlikte Çizelge 3.14' de verilmiştir.

Çizelge 3.14. Kitozan ve PLGA bazlı mikropartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri

Formülasyon Adı	Zeta Potansiyeli (mV±SS, n=5)	Formülasyon Adı	Zeta Potansiyeli (mV±SS, n=5)
CH1	10,72±1,15	P1	-13,75±1,63
CH2	13,28±0,42	P2	-20,26±0,69
CH3	9,56±0,59	P3	-17,80±1,52
CH4	14,38±0,46	P4	-16,02±0,49
CH5	14,44±0,62	P5	-18,34±0,69
CH6	9,67±0,66	P6	-15,00±0,62
CH7	8,20±0,24	P7	14,16±0,72
CH8	11,68±0,89	P8	31,30±2,26
CH9	9,16±0,33	P9	32,92±1,24
CH10	- *	P10	12,84±0,69
CH11	10,30±0,73	P11	30,04±1,97
CH12	15,00±0,53	P12	32,22±0,78

*Mikropartikül elde edilemedi

3.3. Termojel Formülasyonlarına Ait Bulgular

3.3.1. Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin pH Değerleri

Bölüm 2.4.1.' de anlatıldığı şekilde termojel üretiminde kullanılan % 0,5 asetik asit çözeltisinde hazırlanmış % 1,6' lık farklı molekül ağırlıklı kitozan çözeltileri ve ultra saf su ile hazırlanmış boraks ve ASP pH ölçümleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 3.15'de verilmiştir.

3.3.2. Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin ve Formülasyonların Viskozite Değerleri

% 0,5 Asetik asit çözeltisinde hazırlanmış % 1,6' lık kitozan çözeltilerinin ve hazırlanan nötral kitozan çözeltilerinin viskoziteleri Bölüm 2.4.2' de anlatıldığı gibi ölçülmüş ve elde edilen değerler Çizelge 3.16'de verilmiştir. Asidik kitozan çözeltilerinin boraks çözeltileri ile nötralizasyonu sonucunda hızlı presipitasyon görülmüş ve homojen bir karışım elde edilememiştir. Bu nedenle T6, T7 ve T8 formülasyonlarının viskozite değerleri ölçülmemiştir.

Çizelge 3.15. Çözelti pH değerleri

Çözelti	pH Değeri
%1,6 a/h Kitozan Çözeltisi (LMW)	4,93
%1,6 a/h Kitozan Çözeltisi (MMW)	4,94
%1,6 a/h Kitozan Çözeltisi (HMW)	4,97
% 15 a/h ASP Çözeltisi	8,13
% 30 a/h ASP Çözeltisi	8,12
% 45 a/h ASP Çözeltisi	8,08
% 60 a/h ASP Çözeltisi	7,50
% 1 a/h Boraks Çözeltisi	9,02
% 2 a/h Boraks Çözeltisi	9,03
% 3 a/h Boraks Çözeltisi	9,05

3.3.3. Termojel Formülasyonlarının Jelleşme Süreleri

Bölüm 2.4.3.'de anlatıldığı şekilde yapılan jelleşme süresi tayini sonucunda, formülasyonlara ait 37 °C' deki jelleşme süreleri Çizelge 3.17' de verilmiştir. Bu analizde T6, T7 ve T8 formülasyonlarının üretimi sırasında presipitasyon görüldüğü için bu formülasyonlar için jelleşme süresi belirlenememiştir.

3.3.4. Termojel Formülasyonlarının Enjekte Edilebilirliği

Bölüm 2.4.4.' de anlatıldığı şekilde 25 °C' de yapılan enjekte edilebilirlik testinin sonuçları Çizelge 3.18' de verilmiştir. Bu tayinde T6, T7 ve T8 formülasyonlarının üretimi sırasında presipitasyon görüldüğü için bu formülasyonlara ait enjektörden çıkış süresi belirlenememiştir.

Çizelge 3.16. Kitozan çözeltilerinin ve formülasyonların viskozite değerleri

Çözelti	Viskozite (cPS)			
	Dönü Hızı (rpm)			
	10	20	50	100
%1,6 a/h Kitozan Çözeltisi (LMW)	360	300	280	264
%1,6 a/h Kitozan Çözeltisi (MMW)	1,88x10 ³	1,60x10 ³	1,22x10 ³	948
%1,6 a/h Kitozan Çözeltisi (HMW)	6,12 x10 ³	5,50x10 ³	2,87x10 ³	1,83x10 ³
T1	120	80	80	- *
T2	960	920	640	596
T3	5,92x10 ³	4,14x10 ³	2,14x10 ³	1,14x10 ³
T4	1,40x10 ³	1,11x10 ³	992	760
T5	1,56x10 ³	1,25x10 ³	1,02x10 ³	772
T6	1,39x10 ³	1,07x10 ³	998	764
T7	- *	- *	- *	- *
T8	- *	- *	- *	- *
T9	- *	- *	- *	- *

*Ölçüm yapılamadı

Çizelge 3.17. Termojel formülasyonlarının jelleşme süreleri

Formülasyon Adı	Jelleşme Süresi (dakika±SS)
T1	Jelleşme olmadı
T2	>30
T3	7±0,54
T4	5±0,32
T5	5±0,25
T6	10±0,63

Çizelge 3.18. Termojel formülasyonlarına ait enjektörden çıkış süreleri

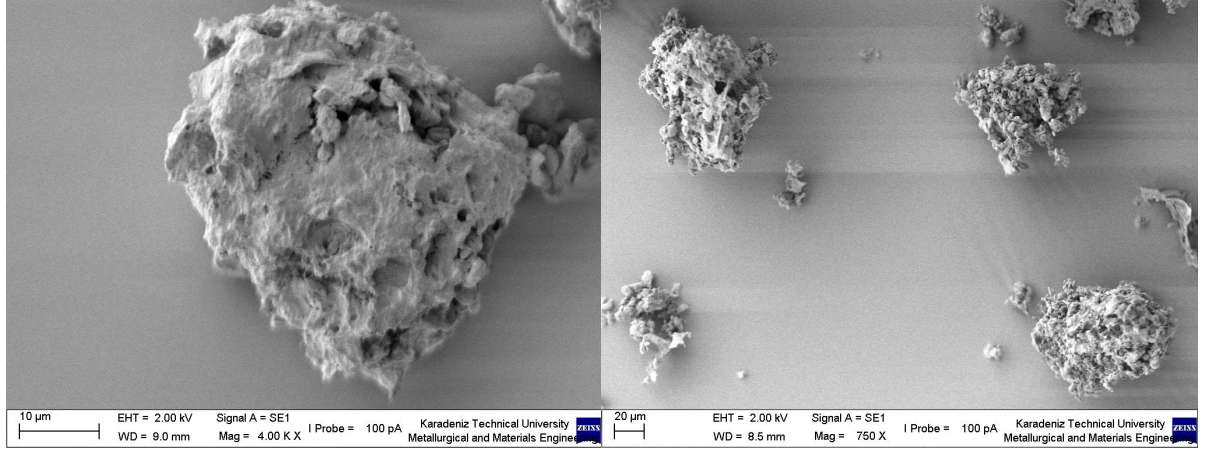
Formülasyon Adı	Enjektörden Çıkış Süresi (saniye±SS)
T1	33±2,5
T2	35±2,7
T3	Akış gerçekleşmedi
T4	85±3,0
T5	80±2,5
T6	79±2,7

3.4. Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Belirlenen Morfolojik Özelliklerine Ait Bulgular

Hazırlanan mikropartiküllerin, termojel formülasyonlarının ve mikropartikül/termojel kombinasyonlarının şekil ve yüzey morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 2.5.’ de belirtilen şekilde SEM analizi yapılmış ve elde edilen mikrograflar Şekil 3.12-3.22’ de verilmiştir.

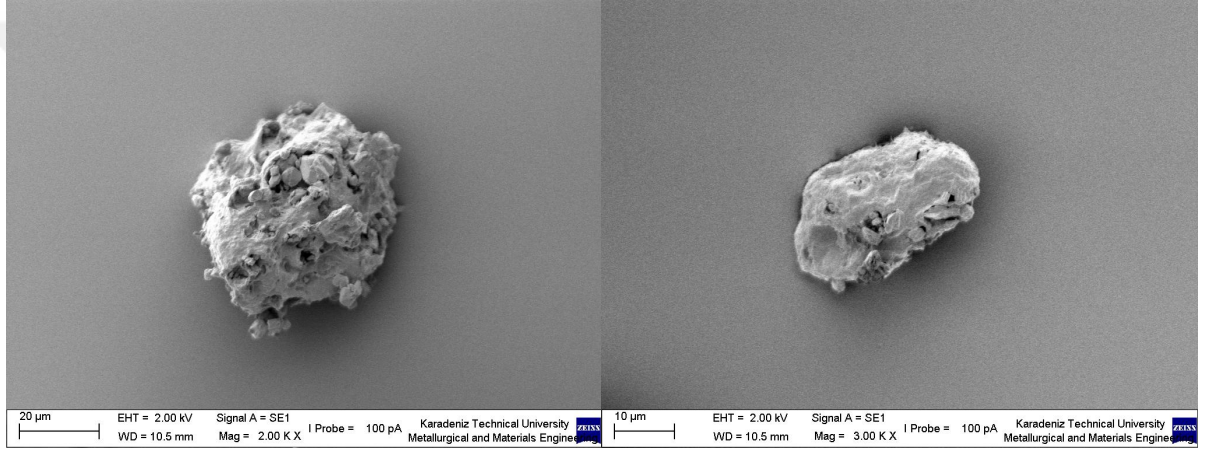
3.5. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizine Ait Bulgular

Bölüm 2.6.’ de belirtilen şekilde yapılan analiz sonucunda elde edilen kitozan ve PLGA bazlı mikropartikül formülasyonlarına, kitozan termojel formülasyonlarına ve formülasyonda kullanılan yardımcı maddelere ait DSC termogramları Şekil 3.23-3.42’ de verilmiştir.



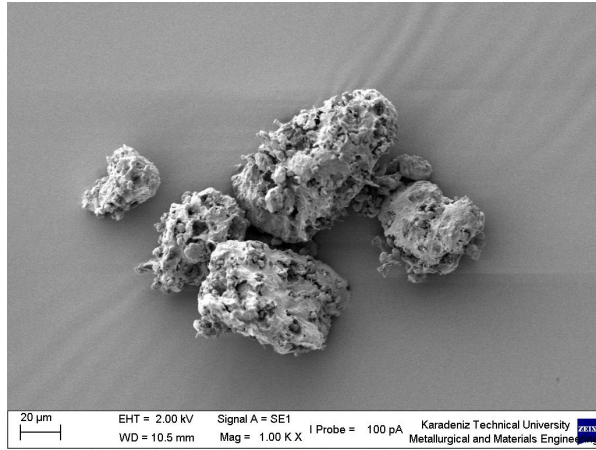
(a) CH8

(b) CH8



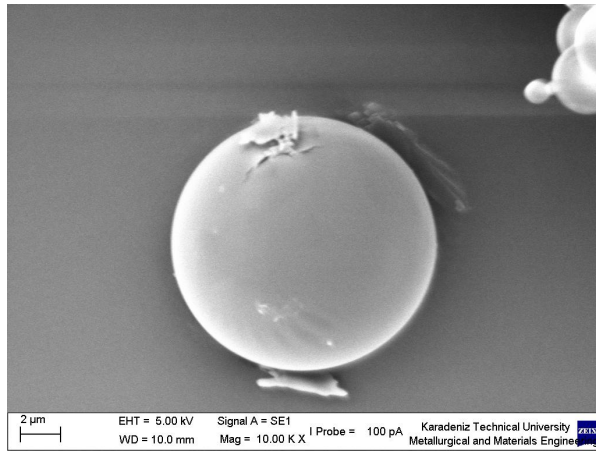
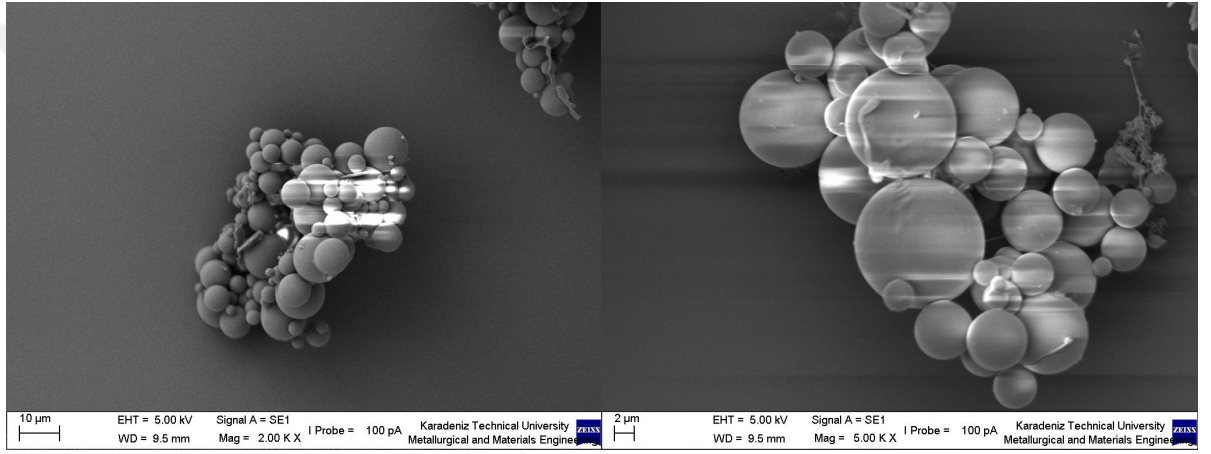
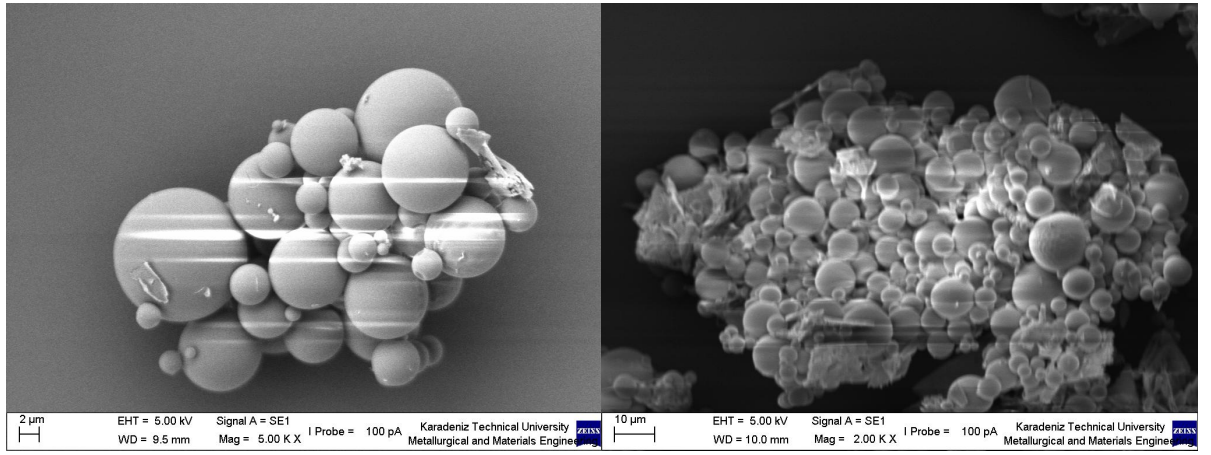
(c) CH3

(d) CH3

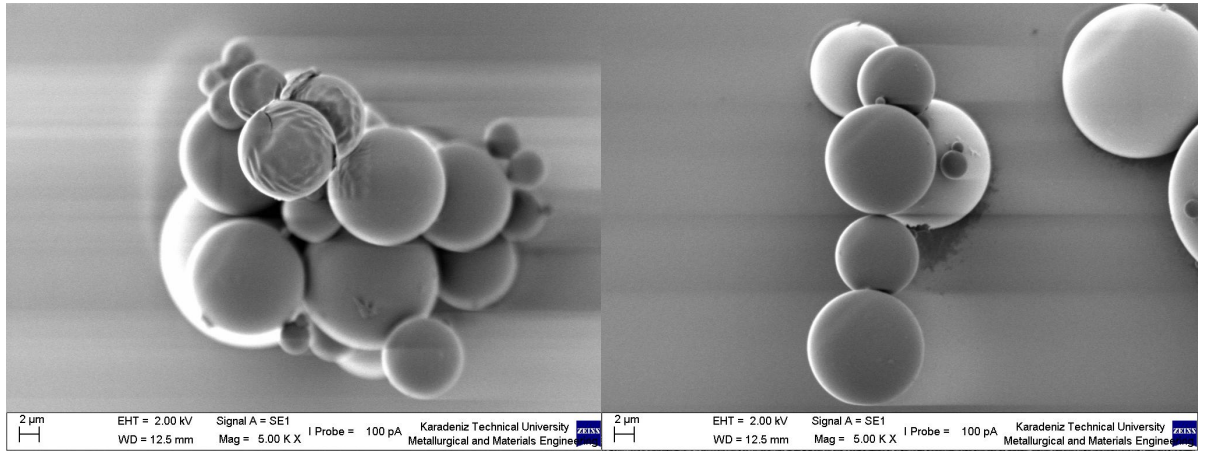


(e) CH3

Şekil 3.12. CH3 ve CH8 formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

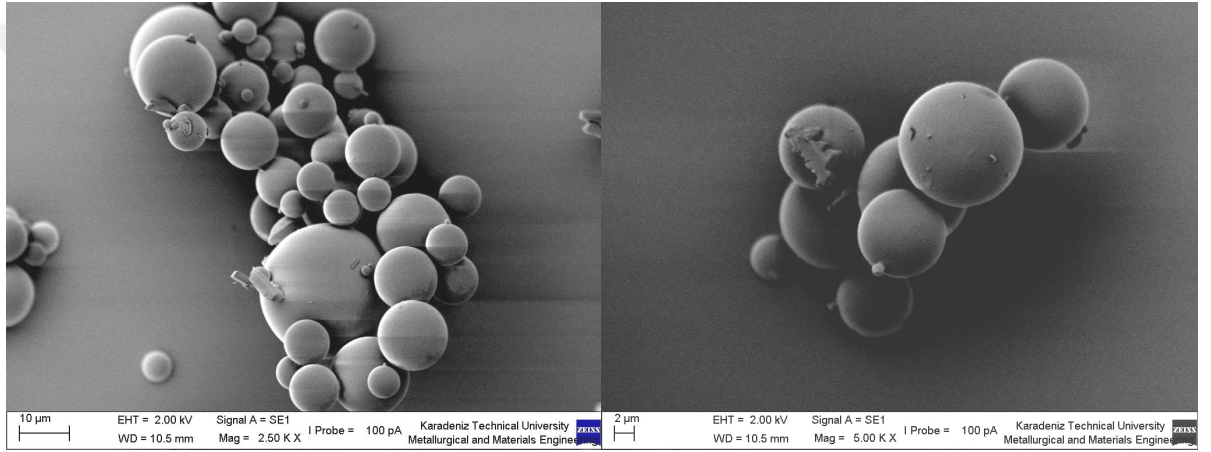


Şekil 3.13. P2 formülasyonuna ait SEM görüntüleri



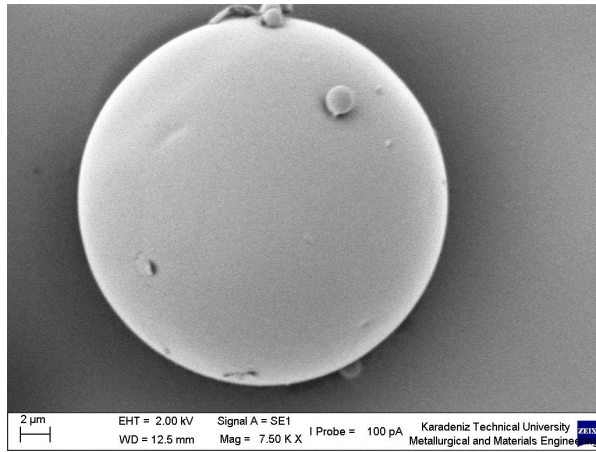
(a)

(b)



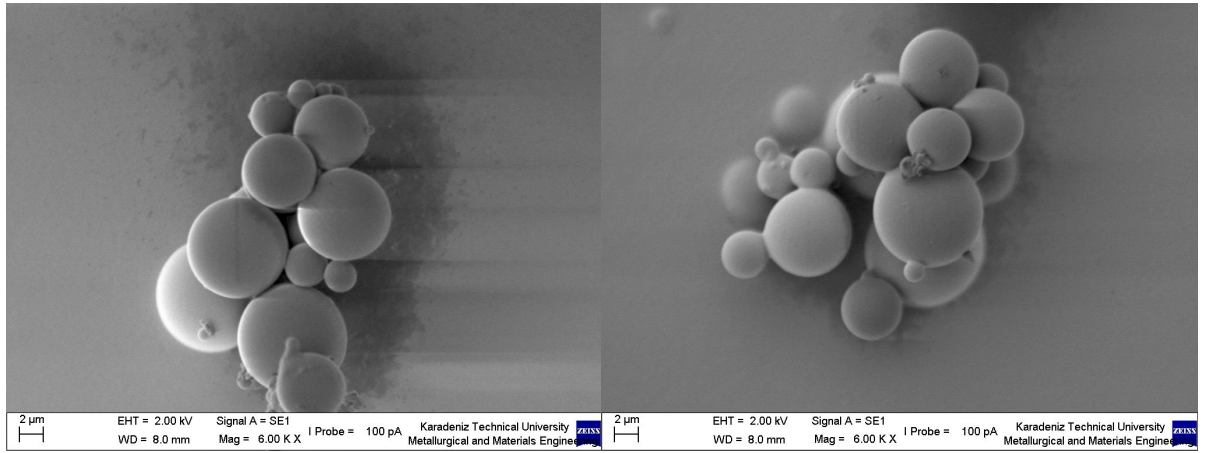
(c)

(d)



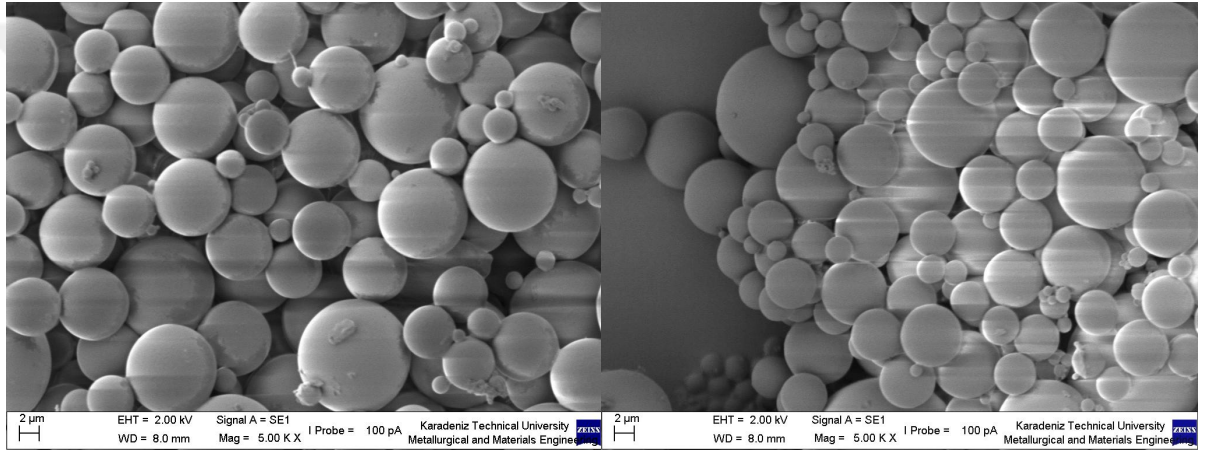
(e)

Şekil 3.14. P5 formülasyonuna ait SEM görüntüleri



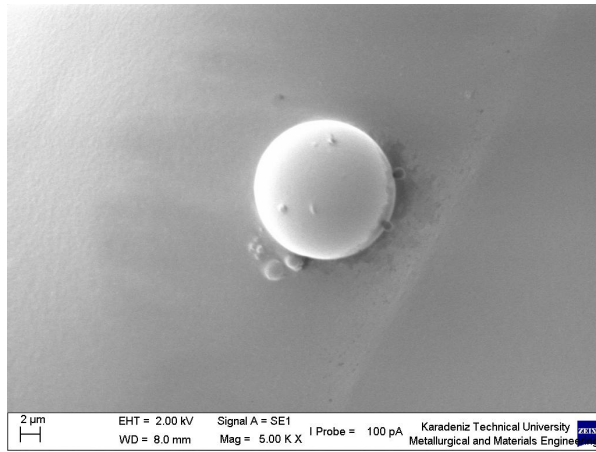
(a)

(b)



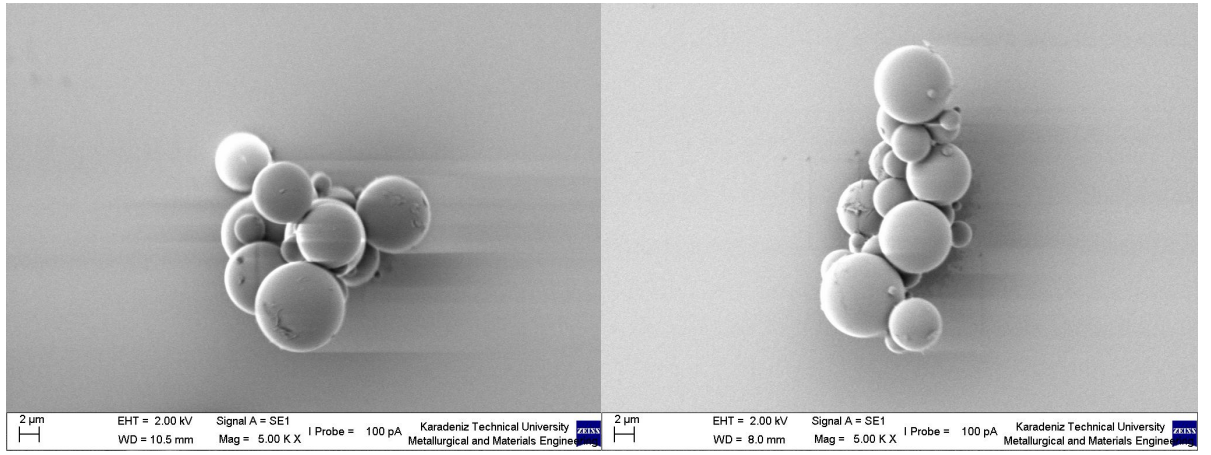
(c)

(d)



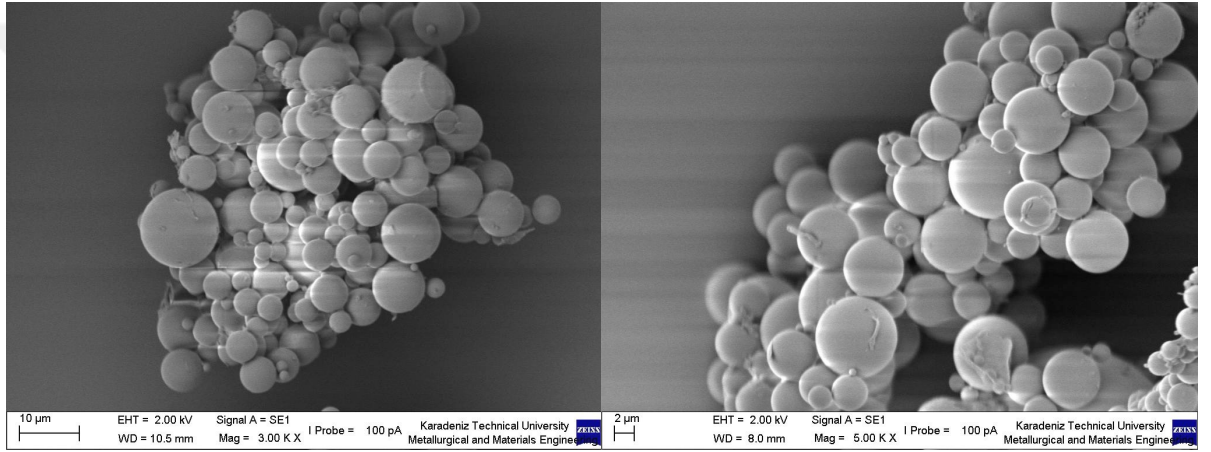
(e)

Şekil 3.15. P6 formülasyonuna ait SEM görüntüleri



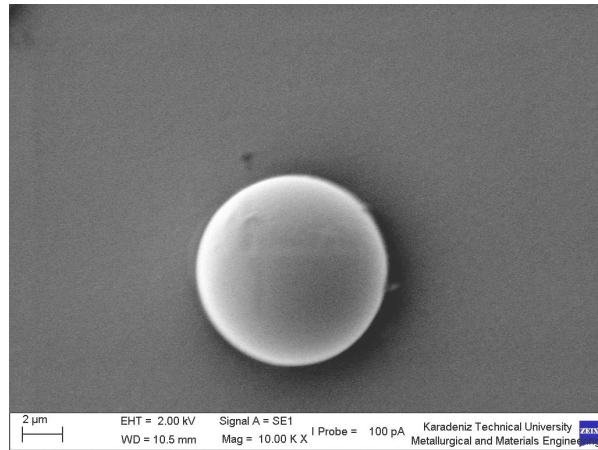
(a)

(b)



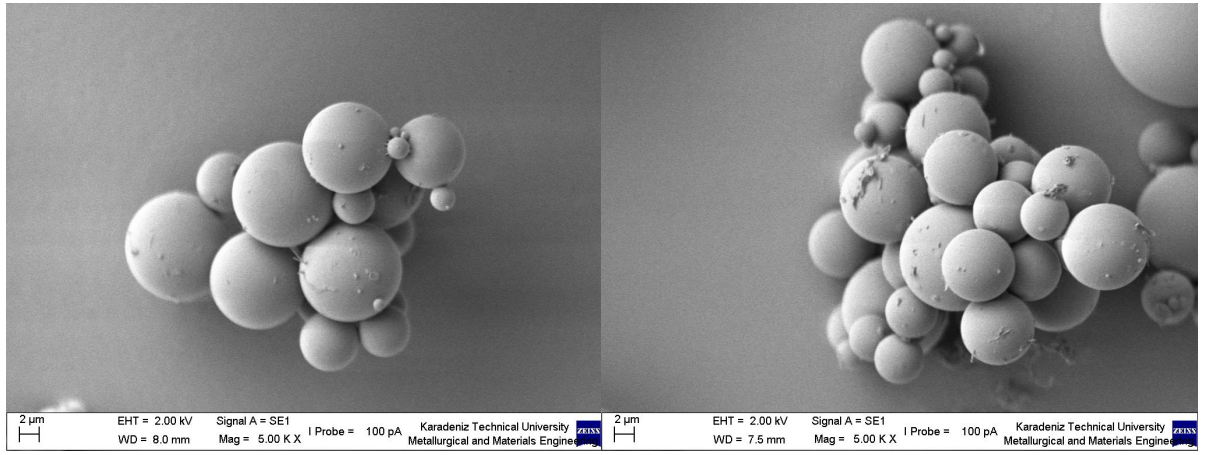
(c)

(d)



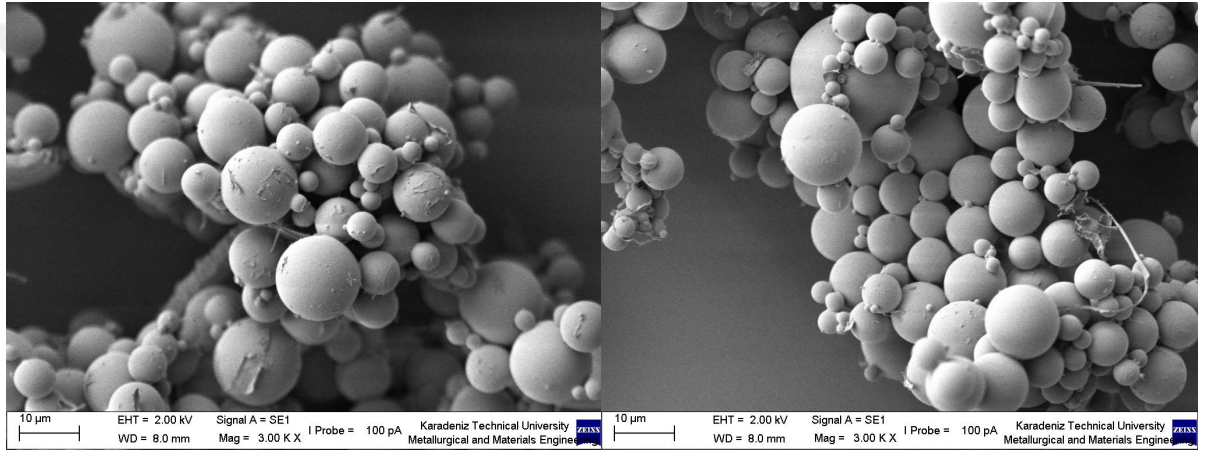
(e)

Şekil 3.16. P11 formülasyonuna ait SEM görüntüleri



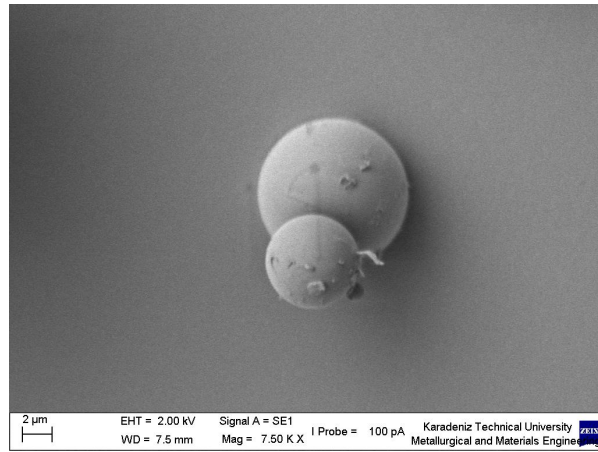
(a)

(b)



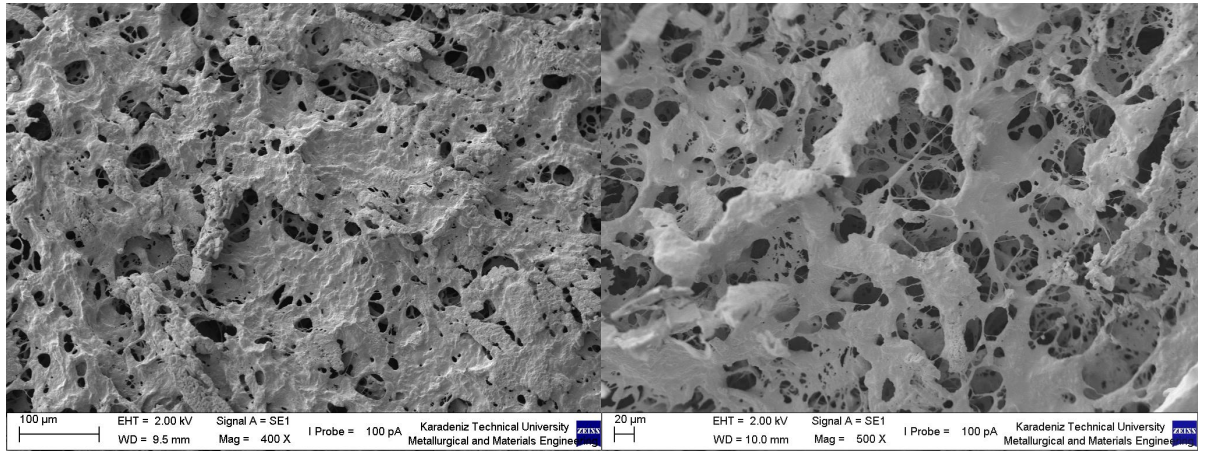
(c)

(d)



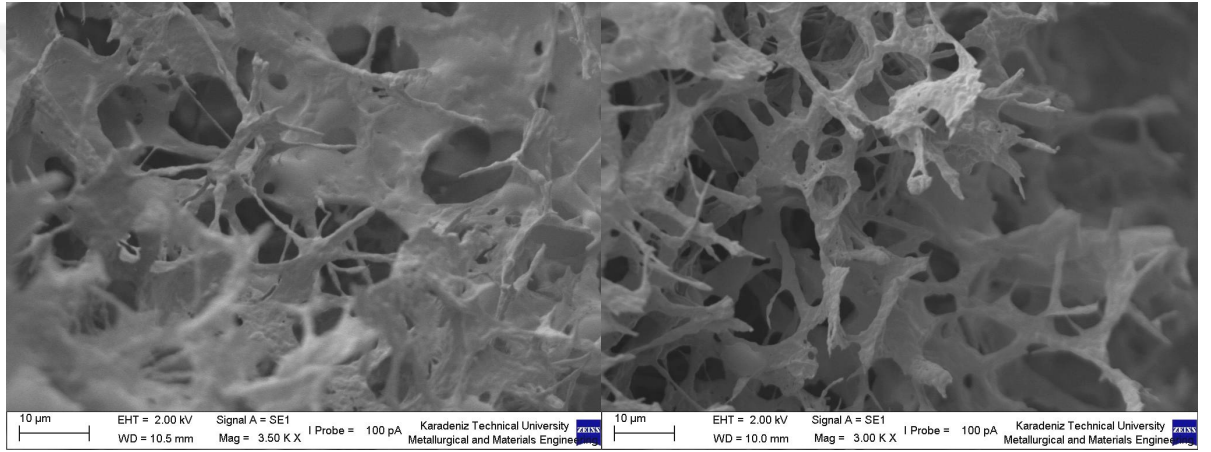
(e)

Şekil 3.17. P13 formülasyonuna ait SEM görüntüleri



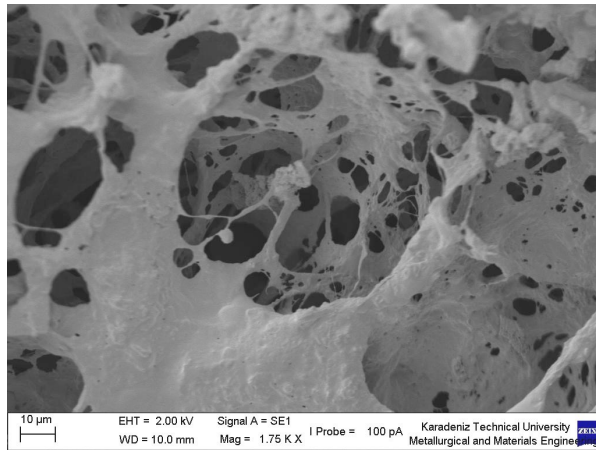
(a)

(b)



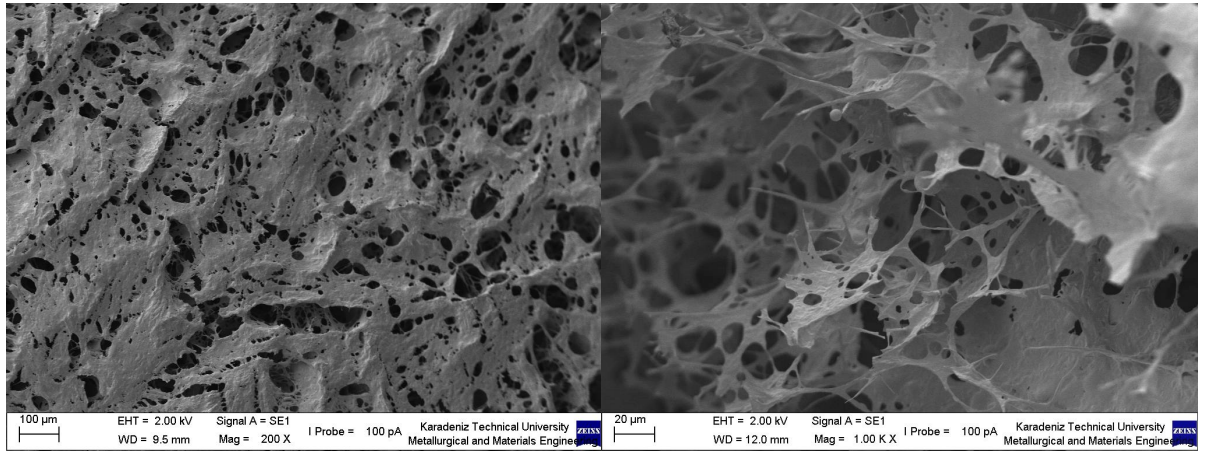
(c)

(d)



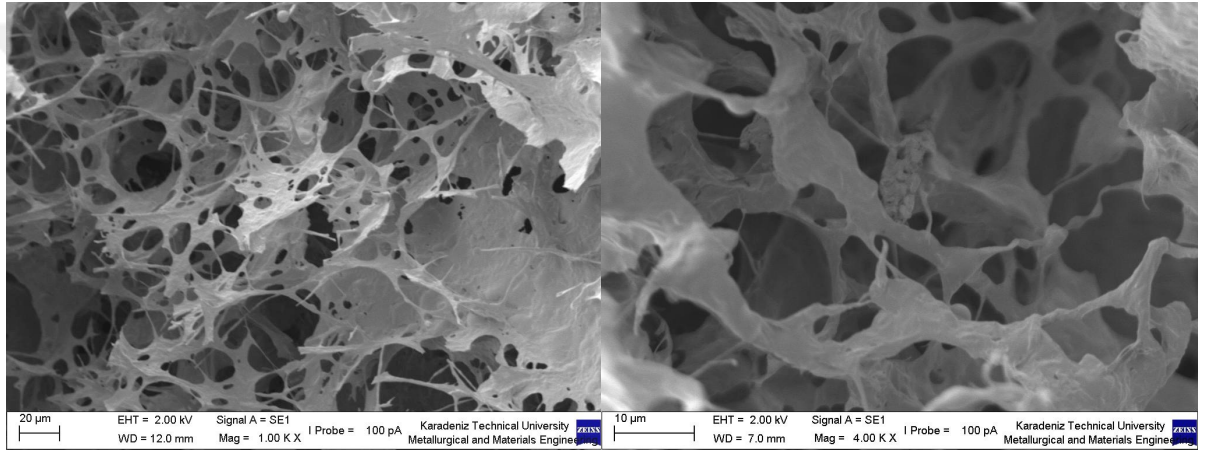
(e)

Şekil 3.18. T3 formülasyonuna ait SEM görüntüleri



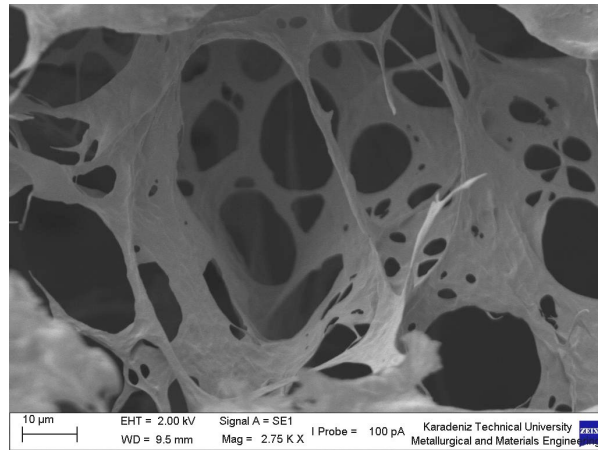
(a)

(b)



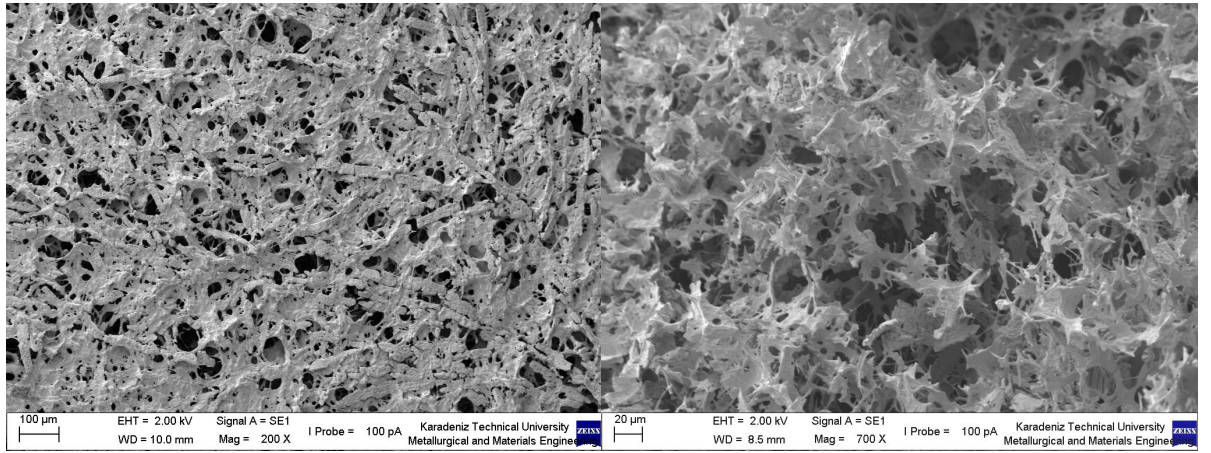
(c)

(d)



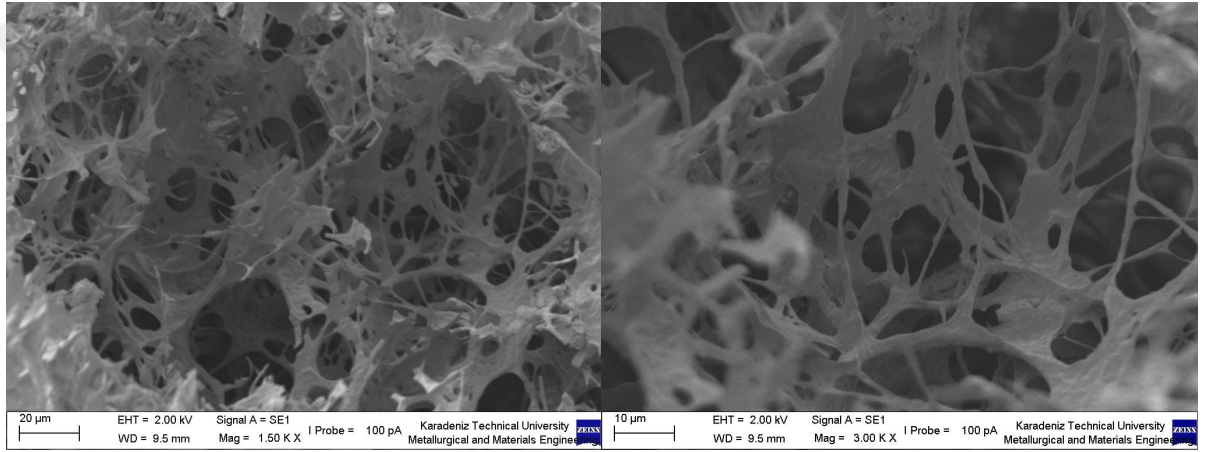
(e)

Şekil 3.19. T4 formülasyonuna ait SEM görüntüleri



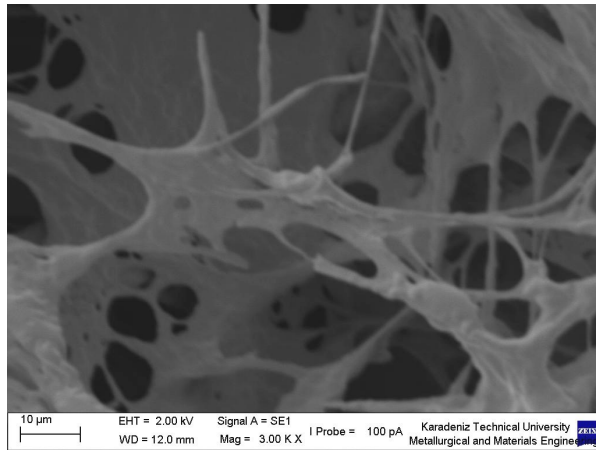
(a)

(b)



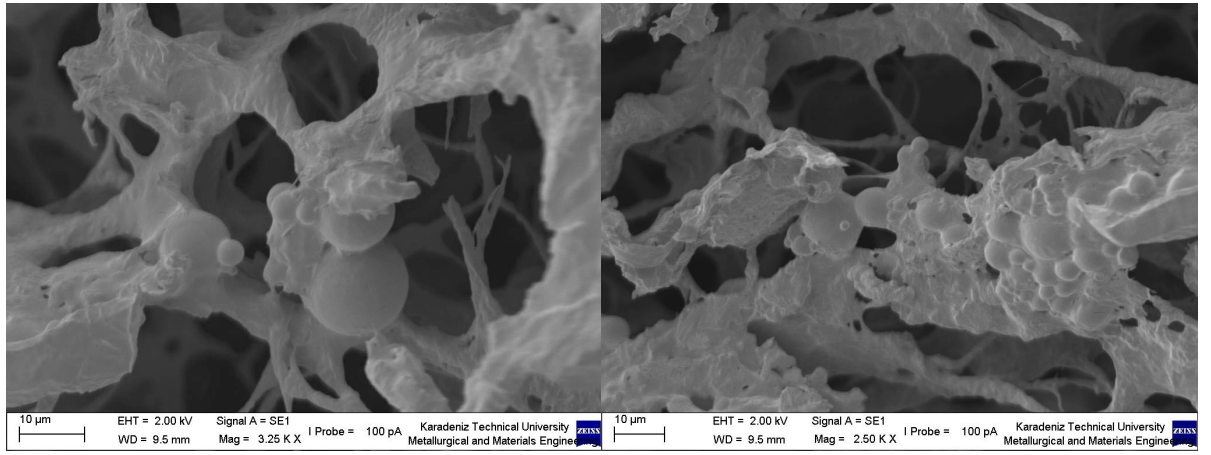
(c)

(d)



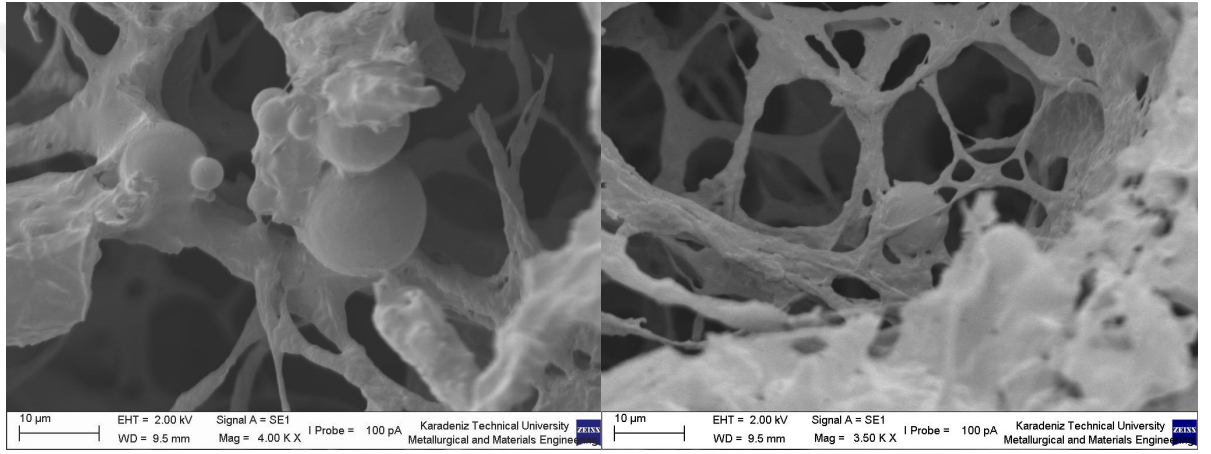
(e)

Şekil 3.20. T5 formülasyonuna ait SEM görüntüleri



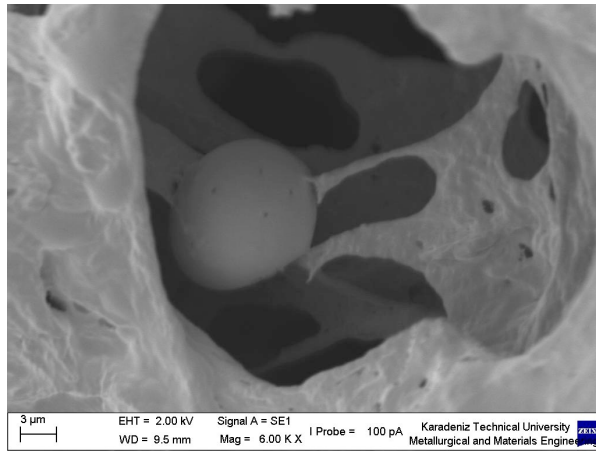
(a)

(b)



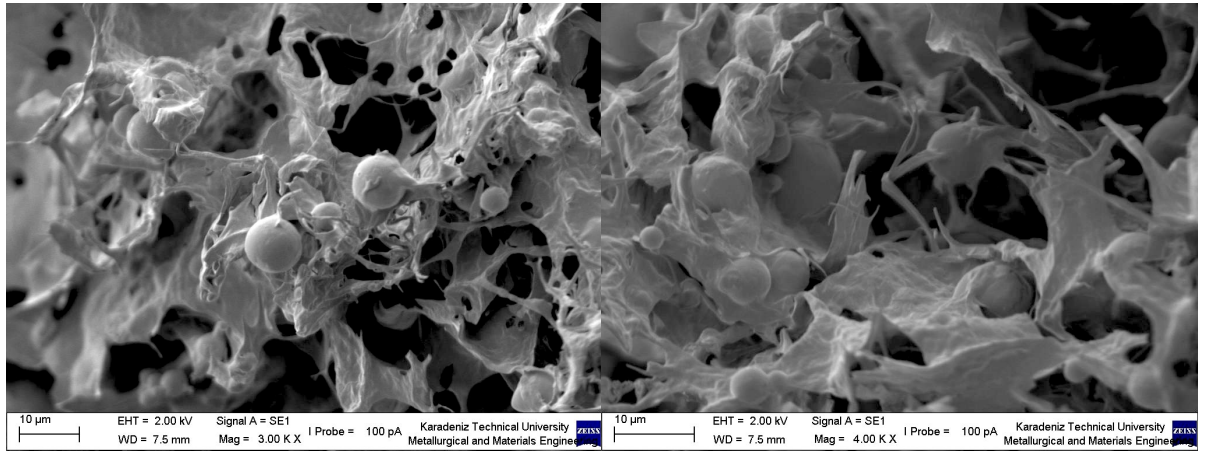
(c)

(d)



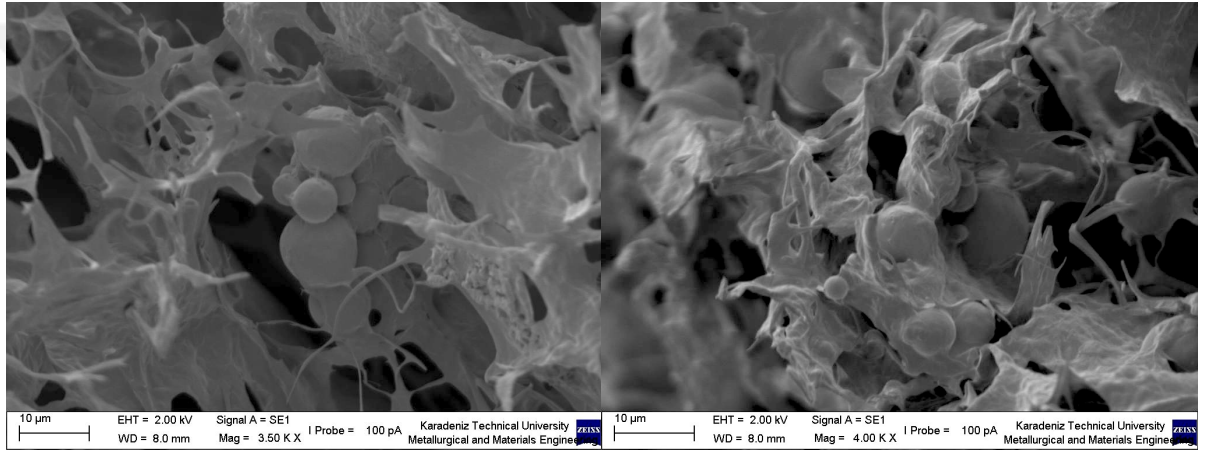
(e)

Şekil 3.21. T4-P13 kombinasyon formülasyonuna ait SEM görüntüleri



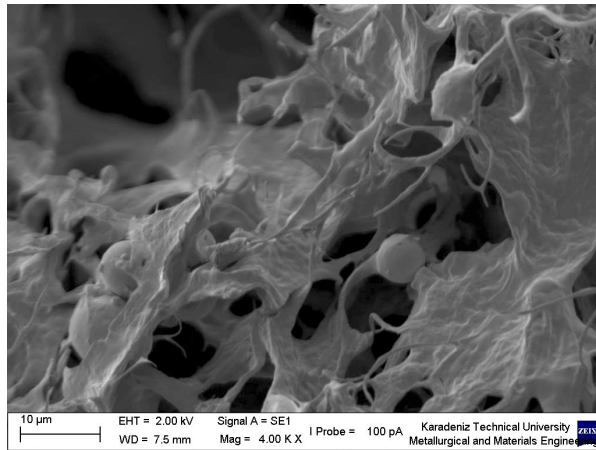
(a)

(b)



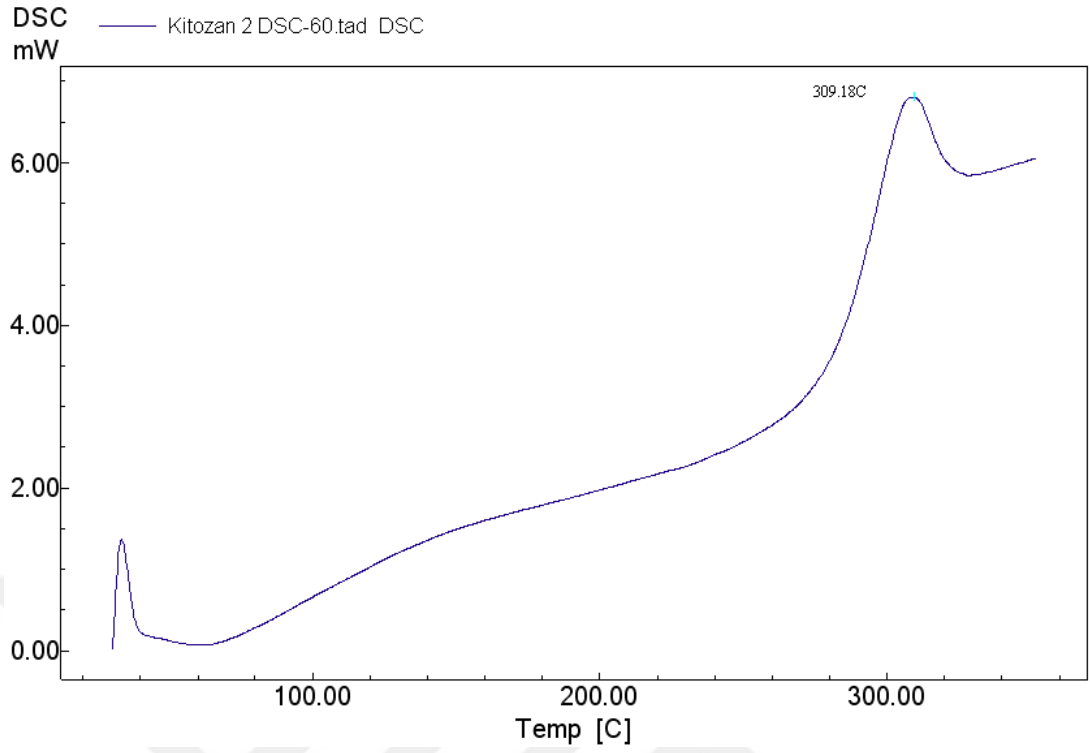
(c)

(d)

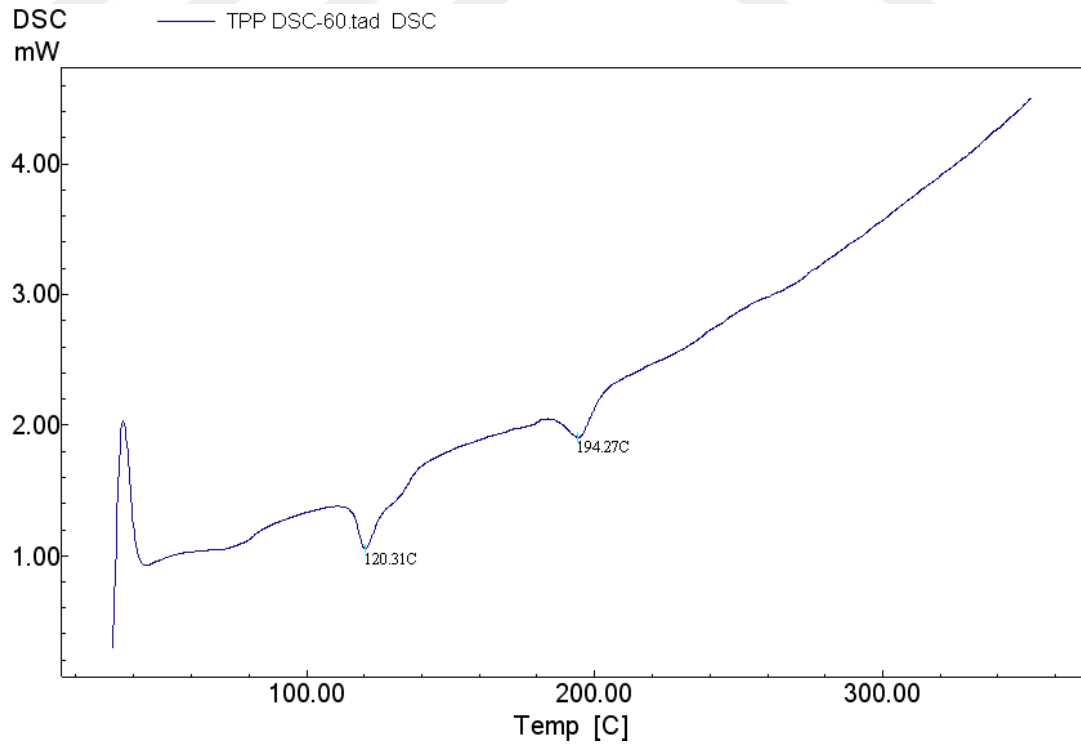


(e)

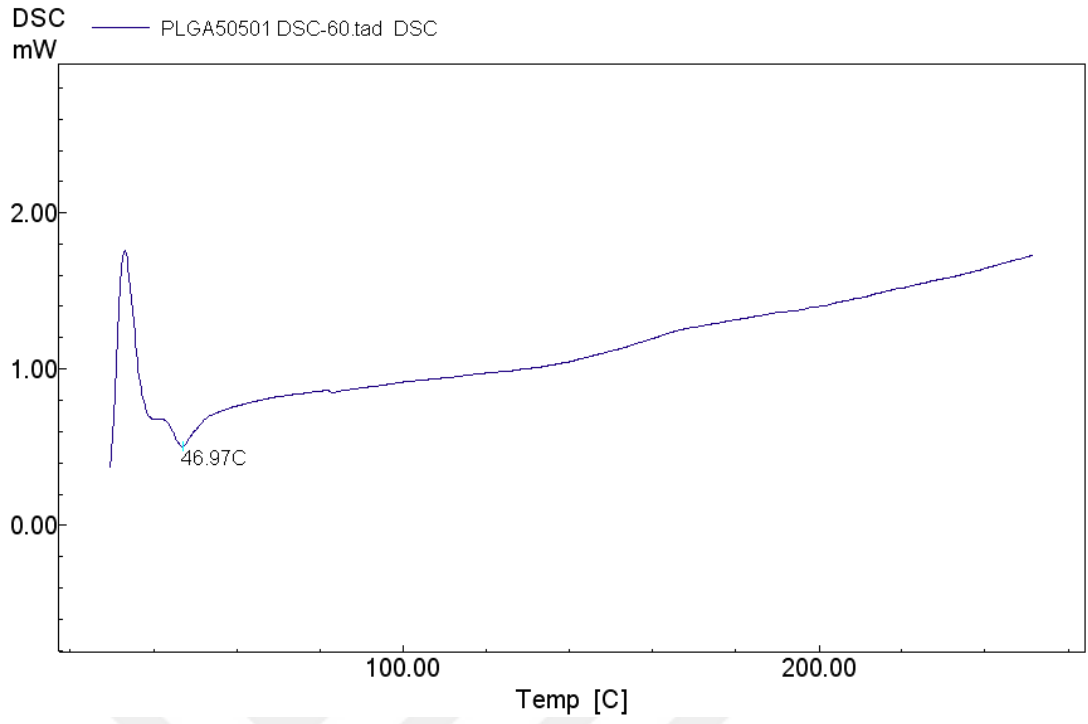
Şekil 3.22. T5-P13 kombinasyon formülasyonuna ait SEM görüntüleri



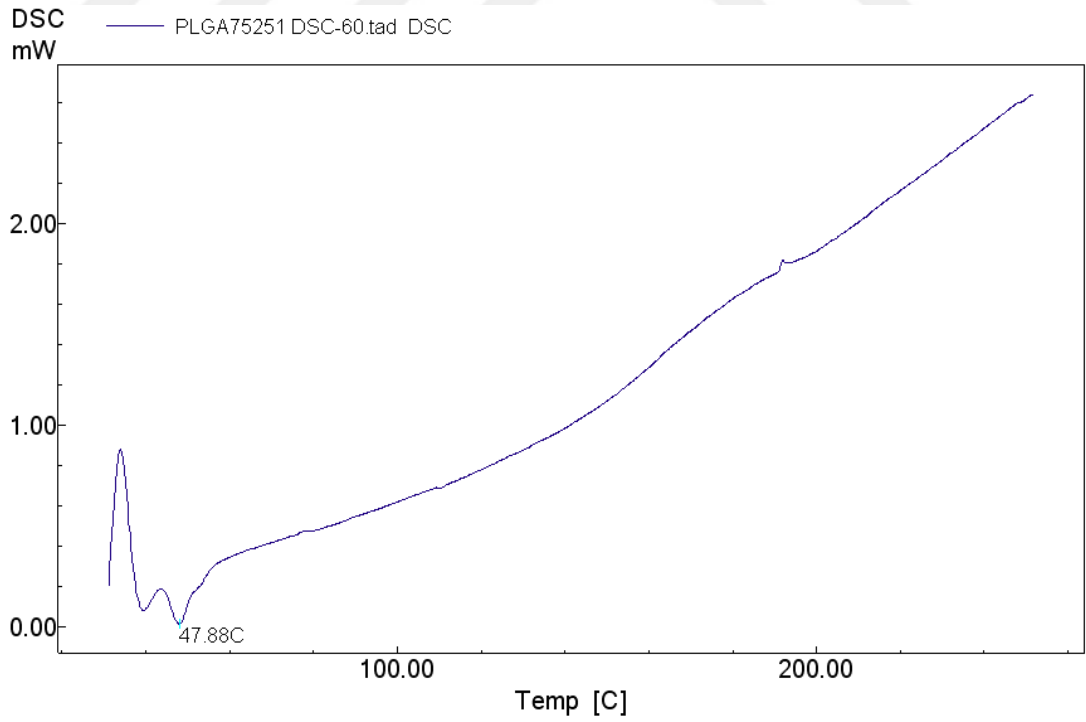
Şekil 3.23. Kitozan(MMW)'a ait DSC termogramı



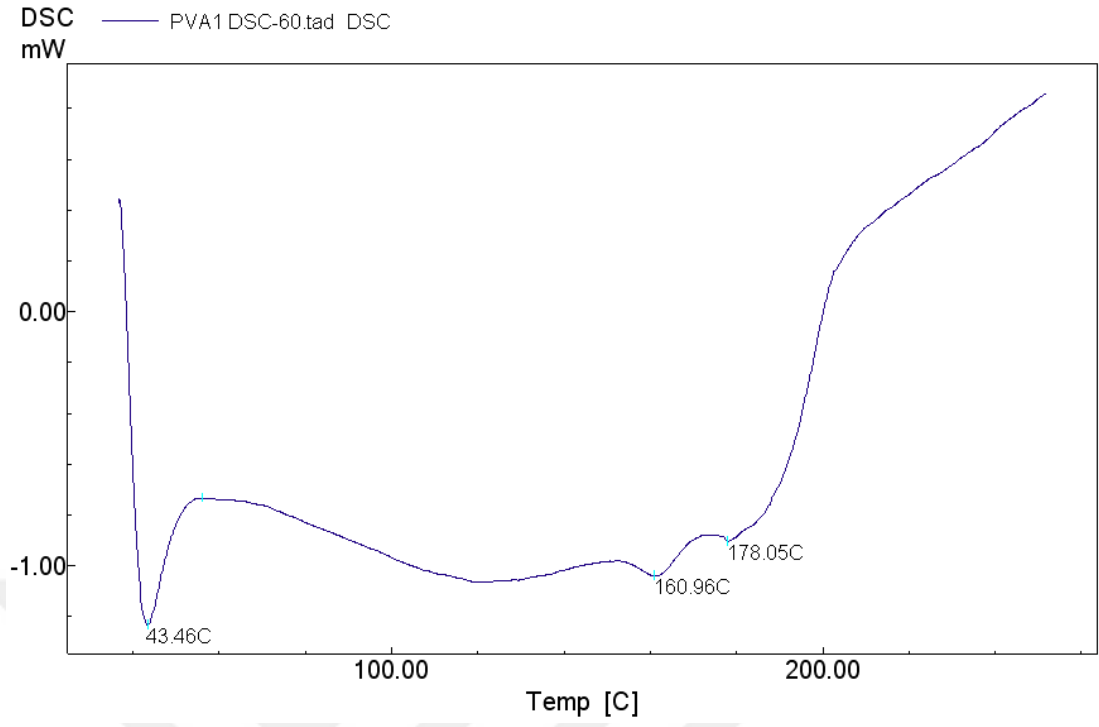
Şekil 3.24. TPP'e ait DSC termogramı



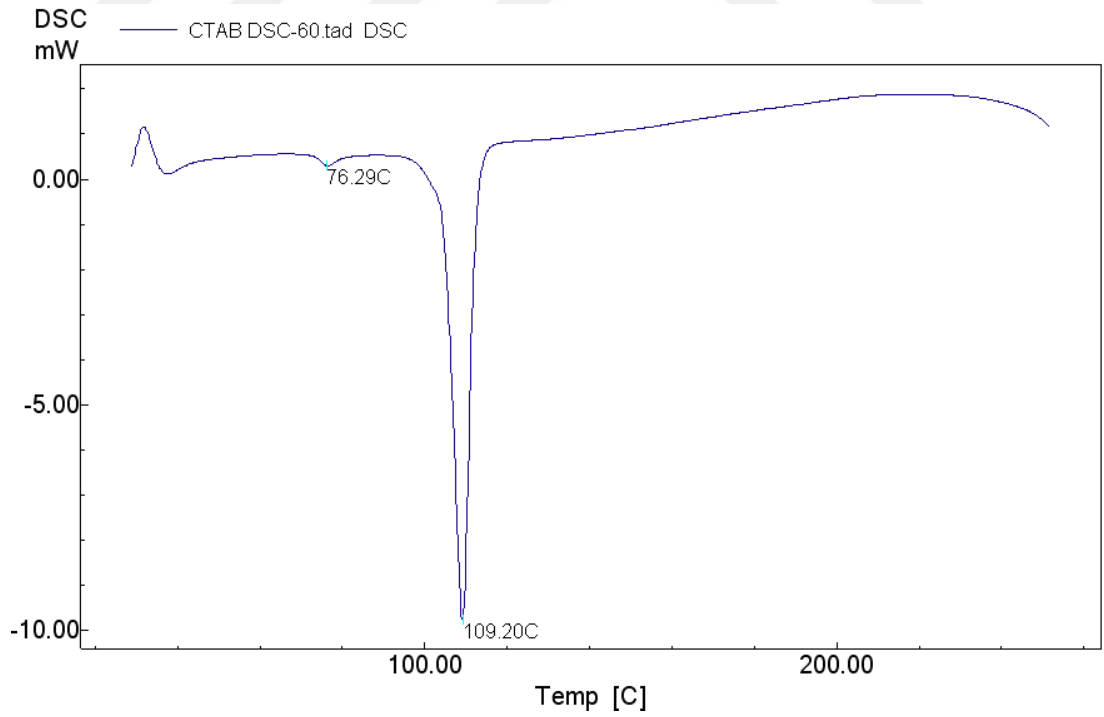
Şekil 3.25. PLGA (50:50)'e ait DSC termogramı



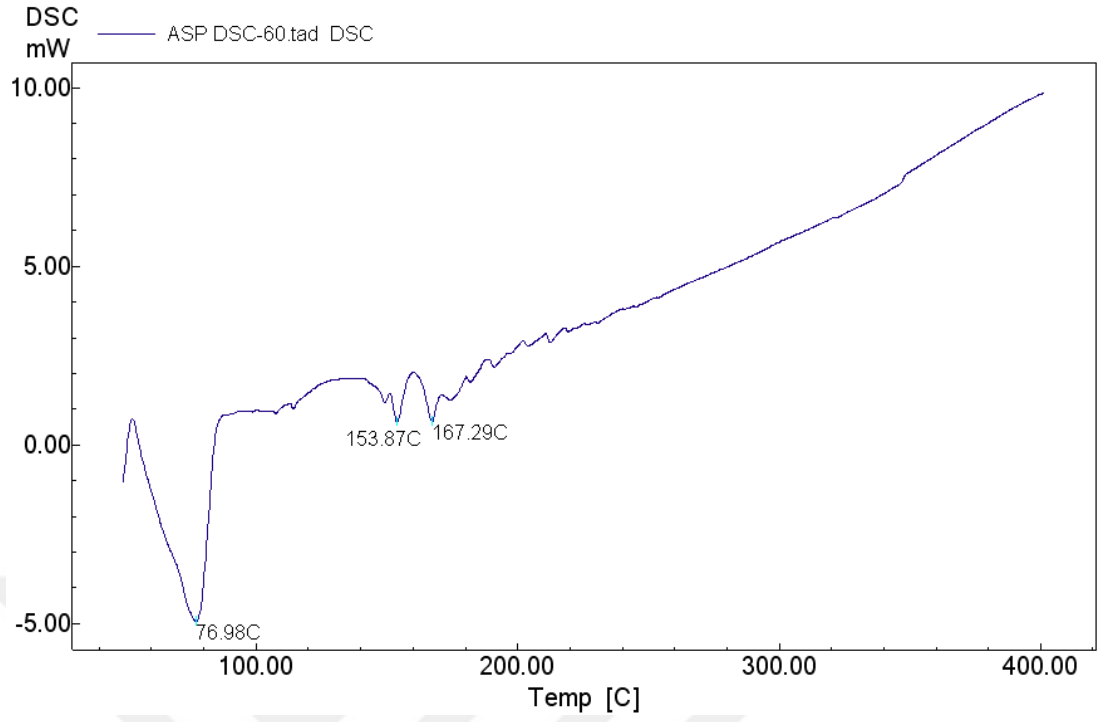
Şekil 3.26. PLGA (75:25)'e ait DSC termogramı



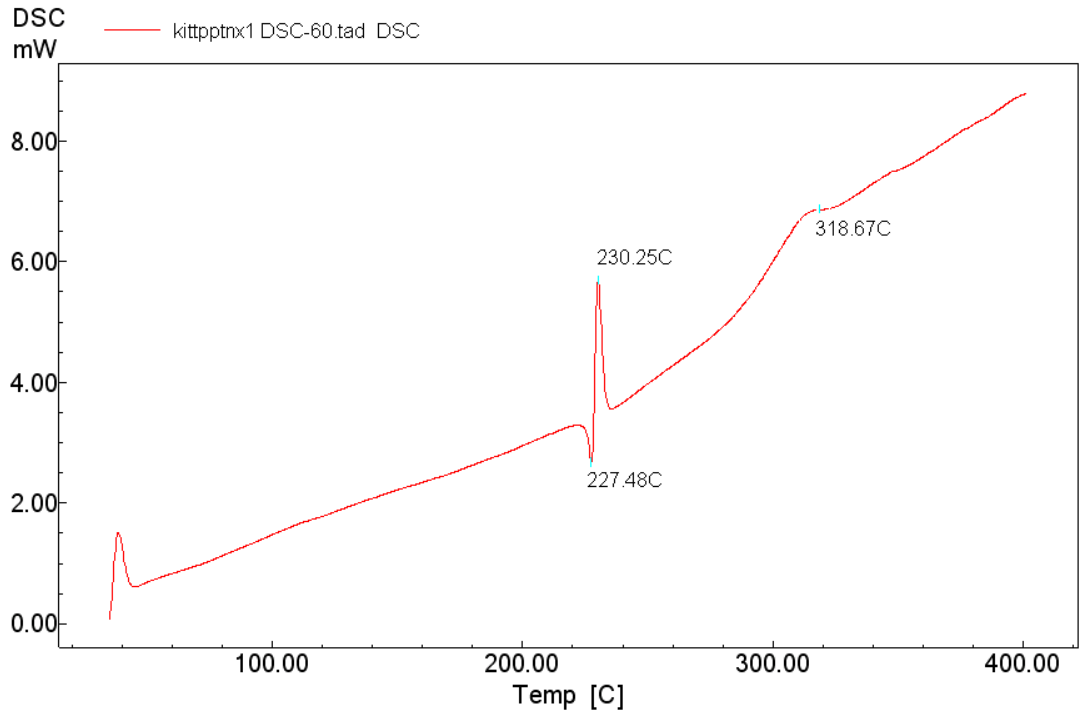
Şekil 3.27. PVA'a ait DSC termogramı



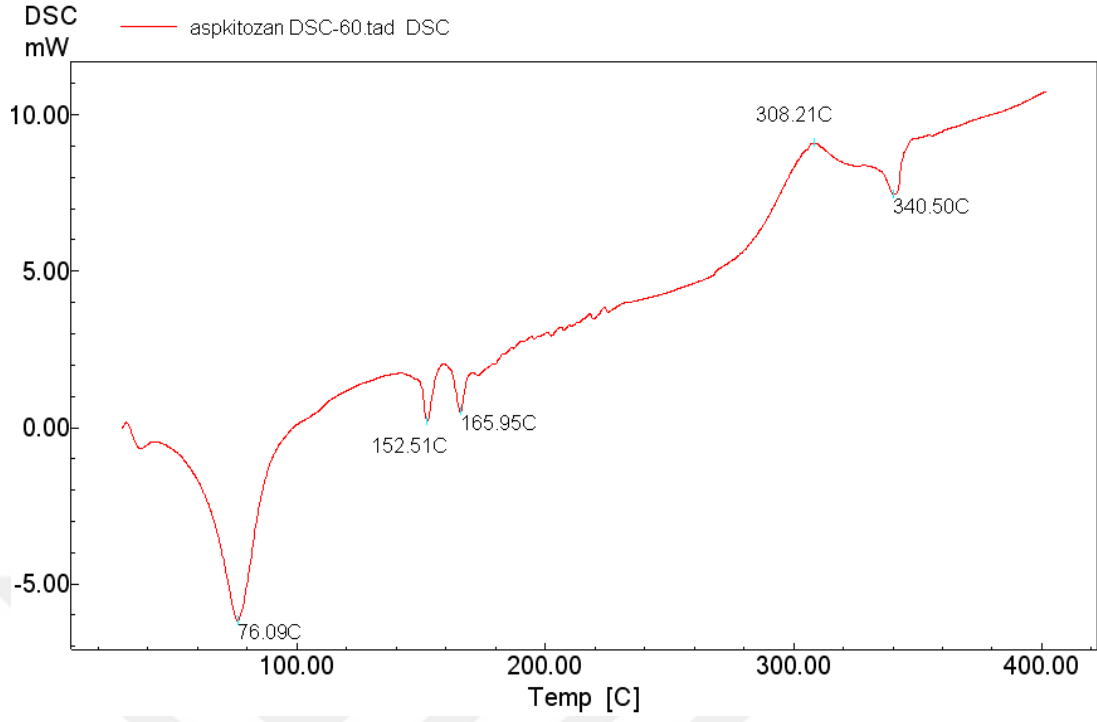
Şekil 3.28. CTAB'a ait DSC termogramı



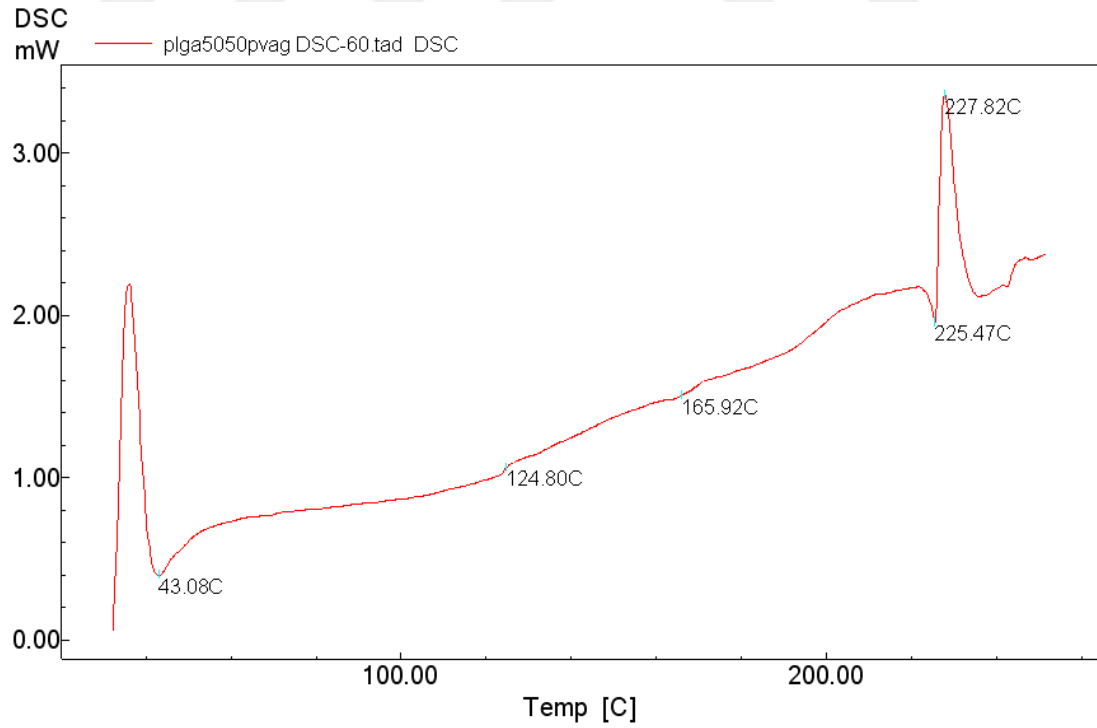
Şekil 3.29. ASP'e ait DSC termogramı



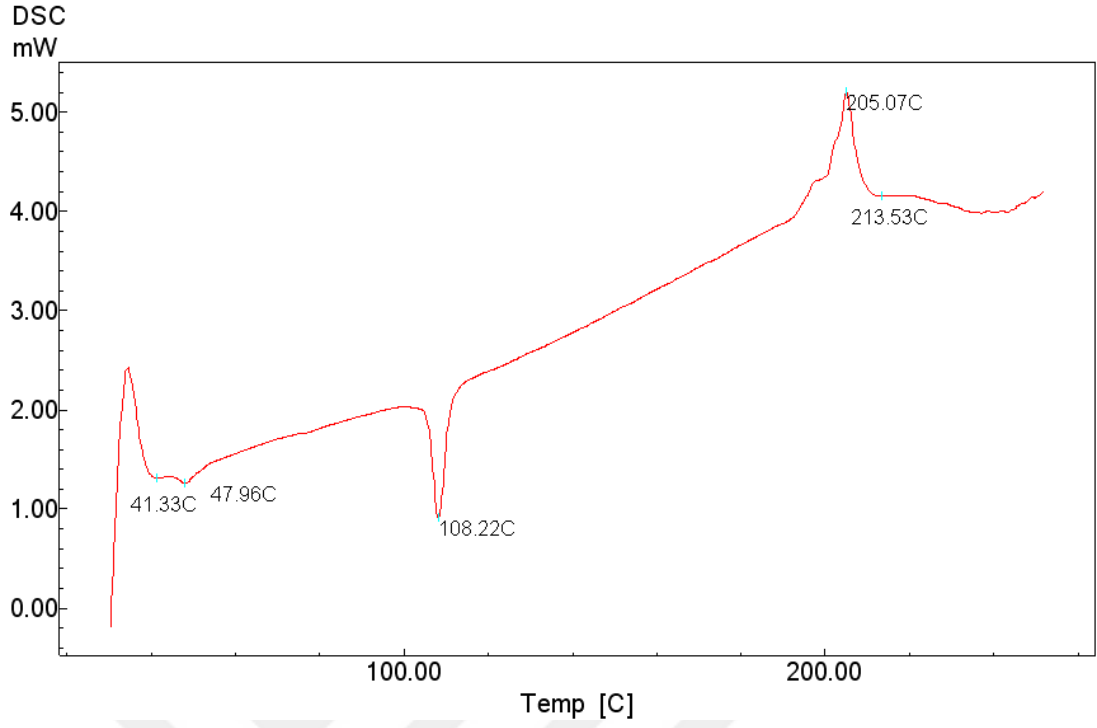
Şekil 3.30. TNX, kitozan ve TPP fiziksel karışımına ait DSC termogramı



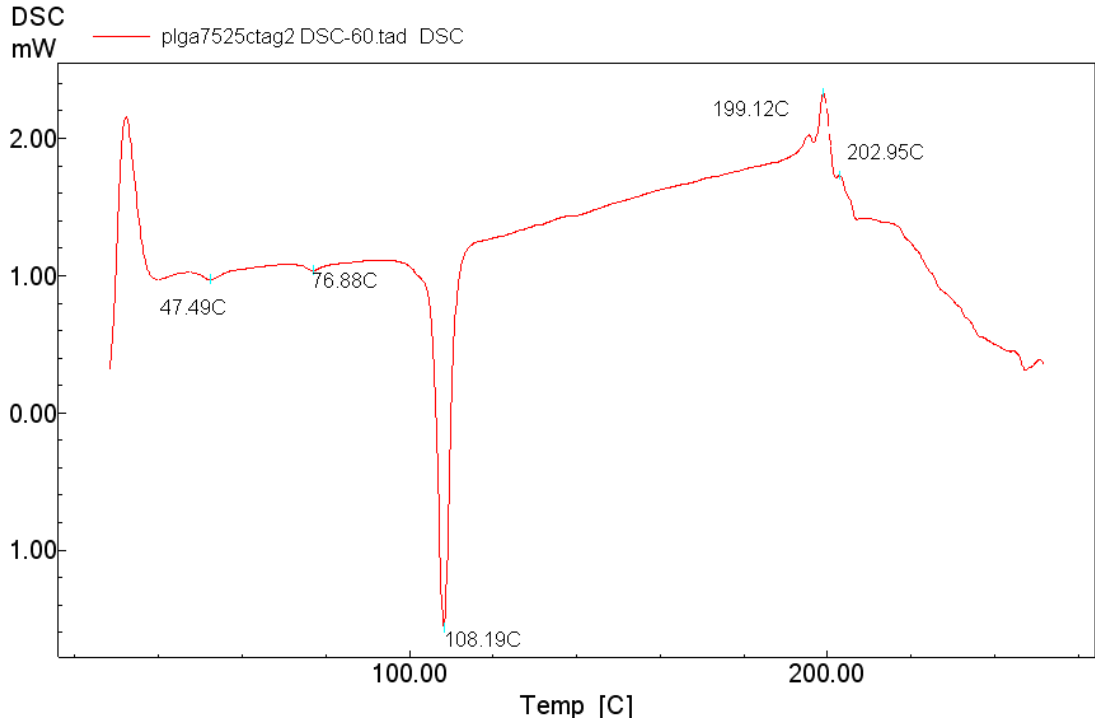
Şekil 3.31. Kitozan ve ASP fiziksel karışımına ait DSC termogramı



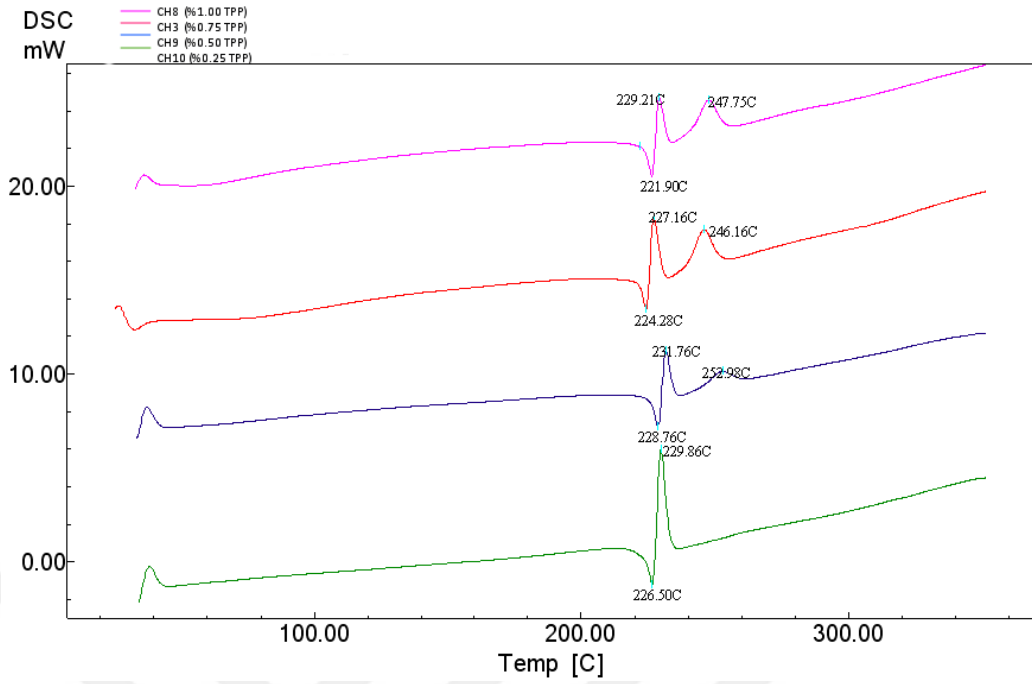
Şekil 3.32. TNX, PLGA(50:50) ve PVA fiziksel karışımına ait DSC termogramı



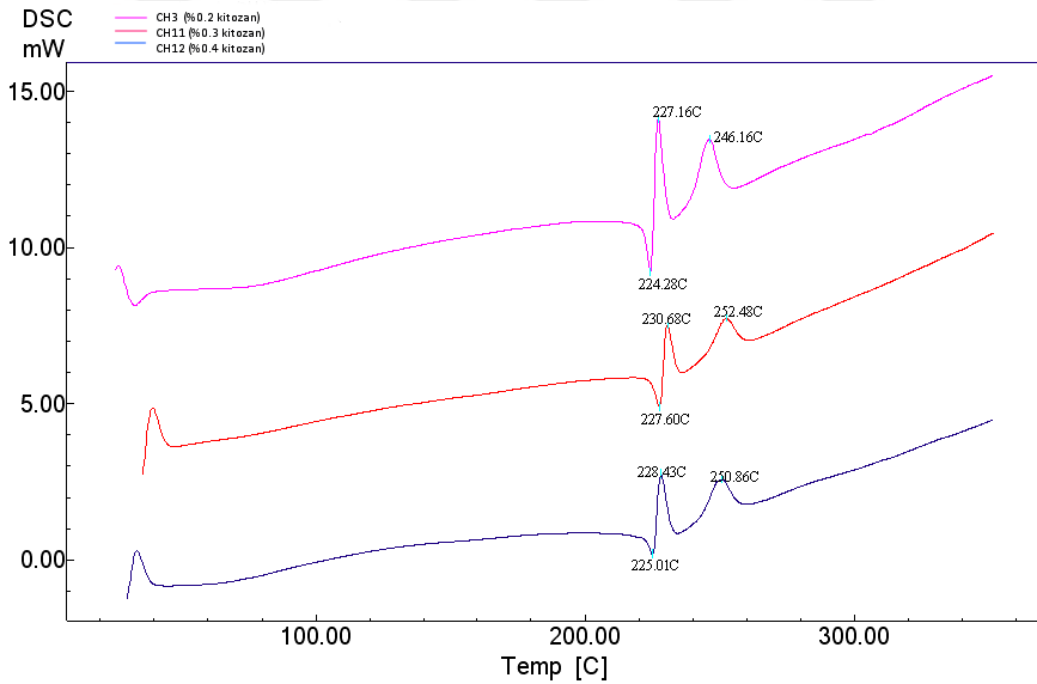
Şekil 3.33. TNX, PLGA(50:50) ve CTAB fiziksel karışımına ait DSC termogramı



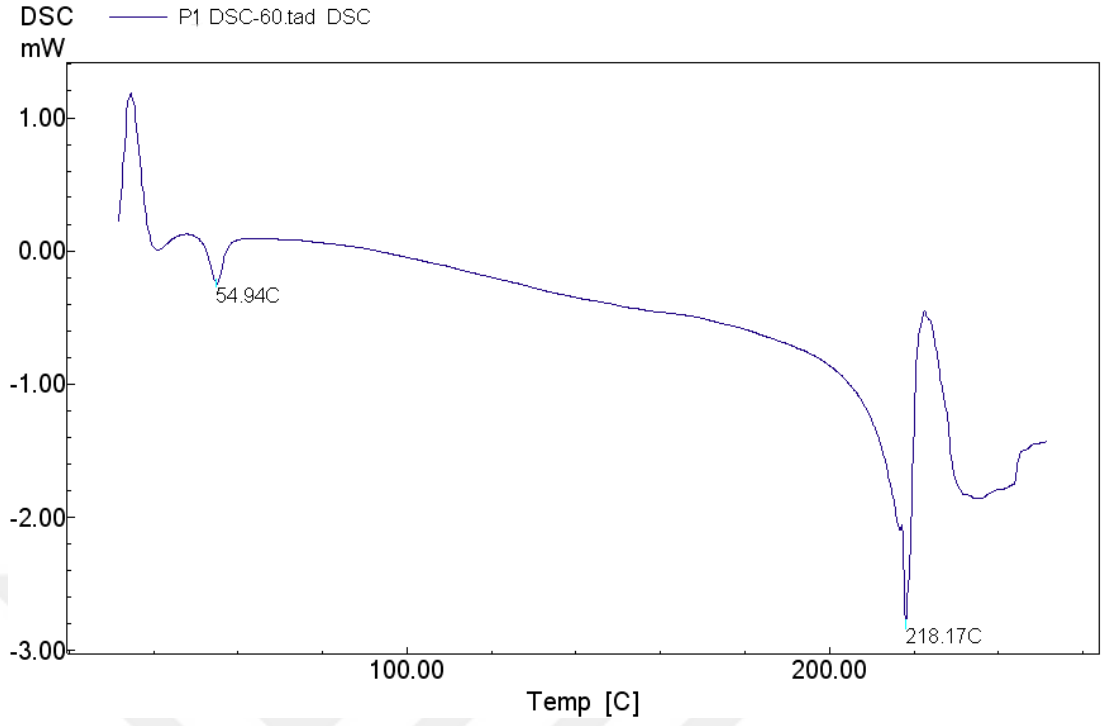
Şekil 3.34. TNX, PLGA(75:25) ve CTAB fiziksel karışımına ait DSC termogramı



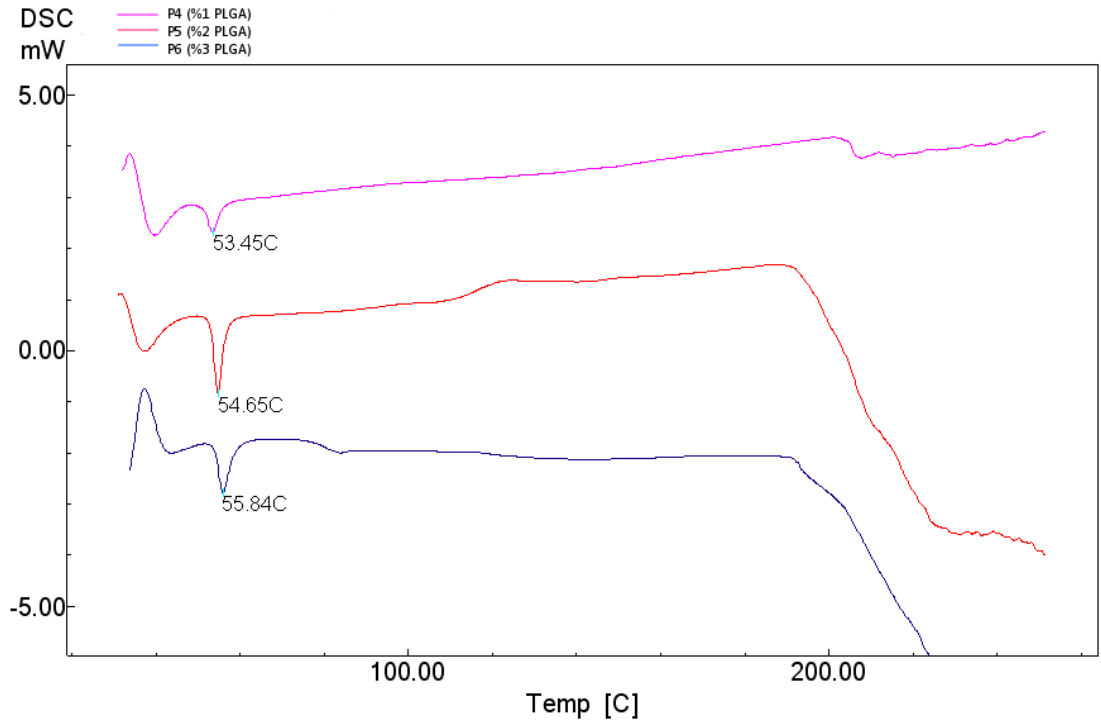
Şekil 3.35. Farklı TPP konsantrasyonlarına sahip CH8(% 1), CH3(% 0,75), CH9(%0,5) ve C10(% 0,25) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları



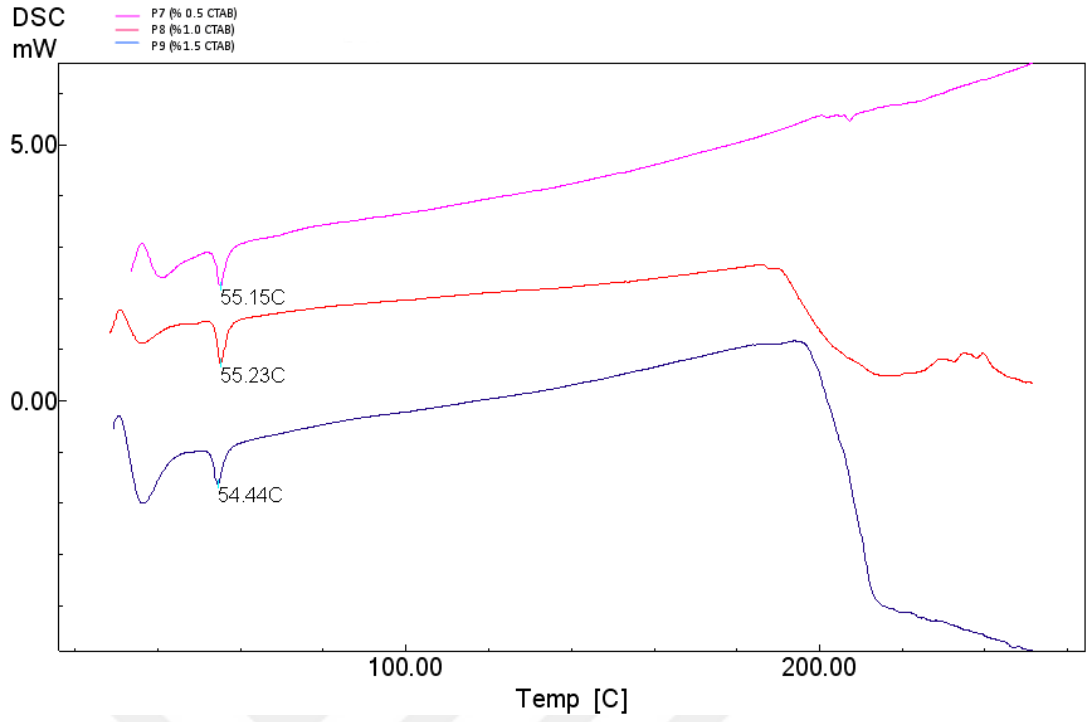
Şekil 3.36. Farklı kitozan konsantrasyonlarına sahip CH3(% 0,2), CH11(% 0,3) ve CH12(% 0,4) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları



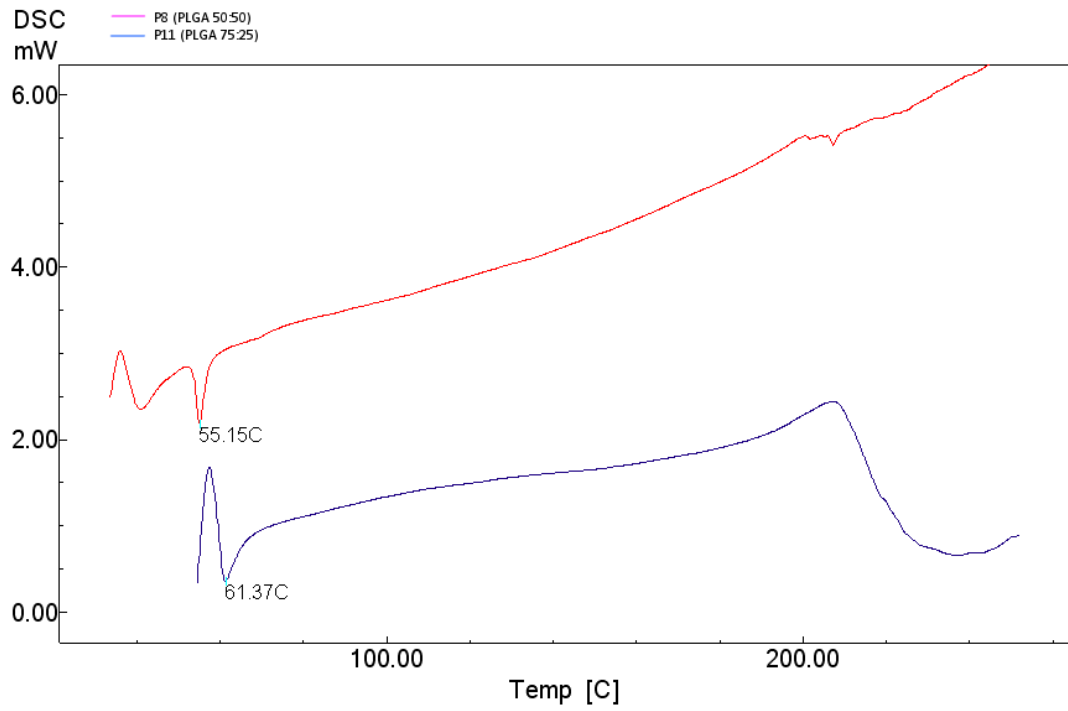
Şekil 3.37. P1 Formülasyonuna ait DSC termogramı



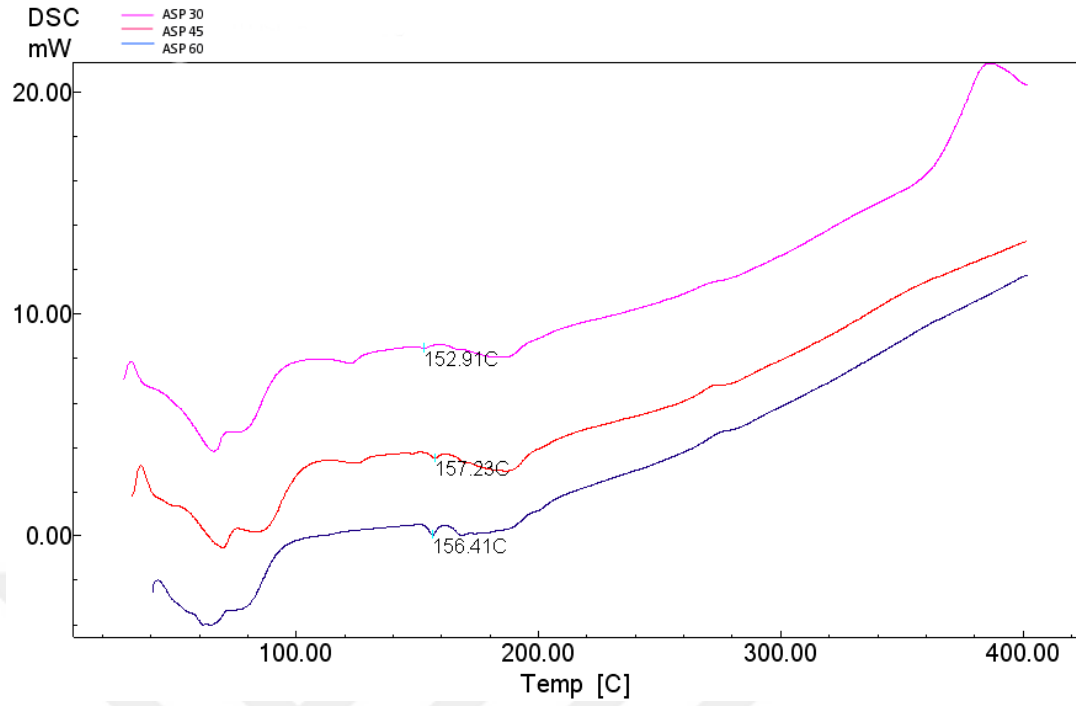
Şekil 3.38. Farklı PLGA konsantrasyonlarına sahip P4(% 1), P5(% 2) ve P6(% 3) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları



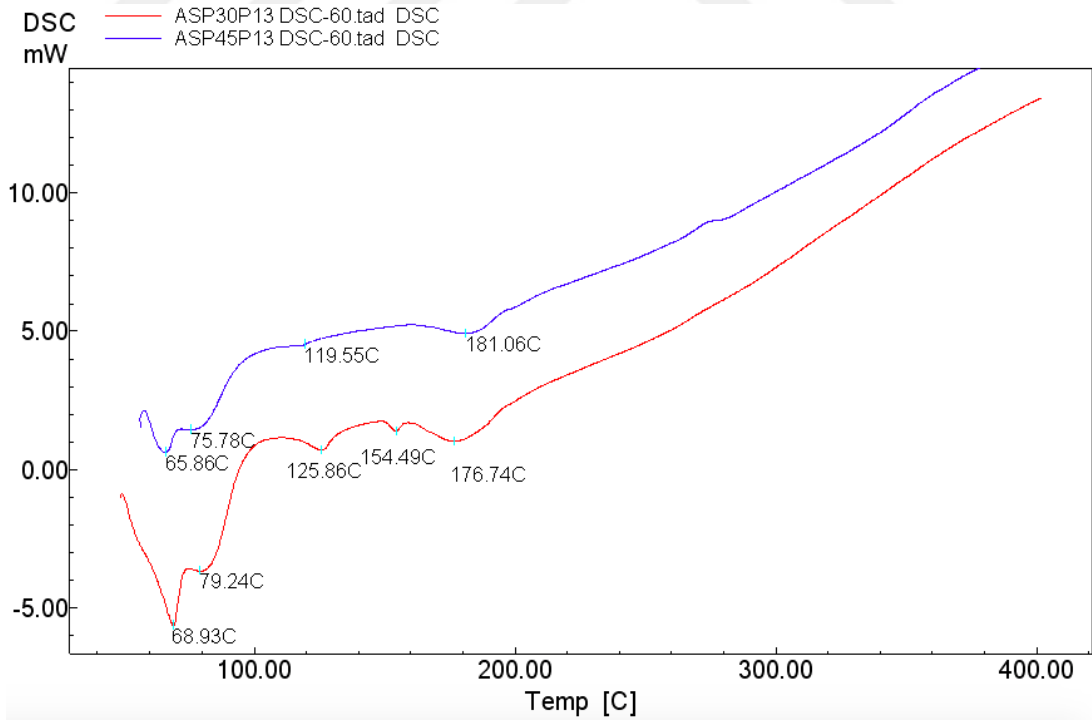
Şekil 3.39. Farklı CTAB konsantrasyonlarına sahip P7(% 0,5), P8(% 1) ve P9(% 1,5) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları



Şekil 3.40. Farklı PLGA türlerine sahip P8(PLGA 50:50) ve P11(PLGA 75:25) kodlu mikropartikül formülasyonlarına ait DSC termogramları



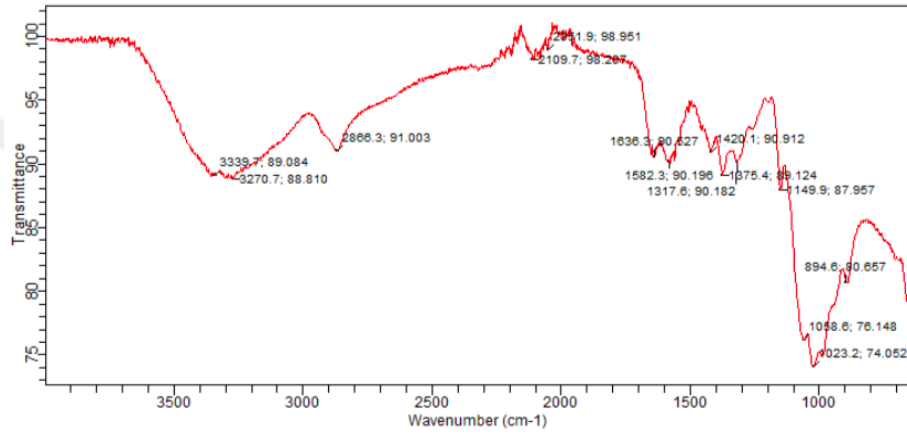
Şekil 3.41. Farklı ASP konsantrasyonlarına sahip T3(% 60), T4(% 45) ve T5(% 30) kodlu termojel formülasyonlarına ait DSC termogramları



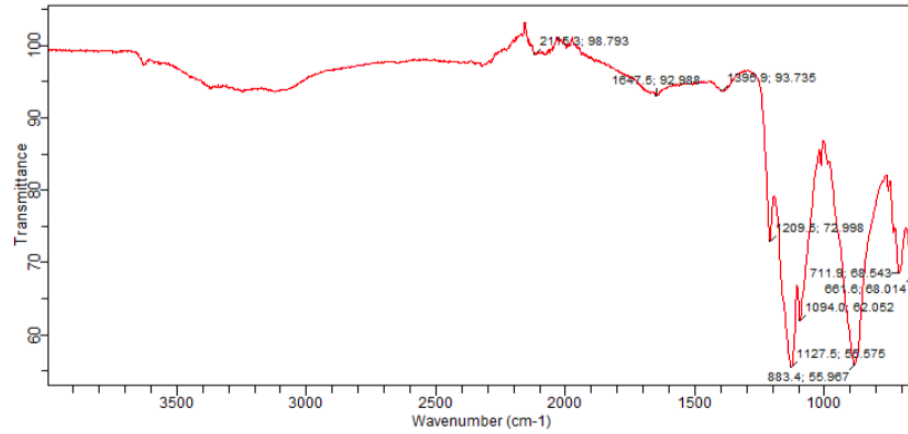
Şekil 3.42. Mikropartikül/Termojel kombinasyon formülasyonlarına (T4(% 45)-P13 ve T5(% 30)-P13) ait DSC termogramları

3.6. Formülasyonların Fourier Dönüümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile Analizine Ait Bulgular

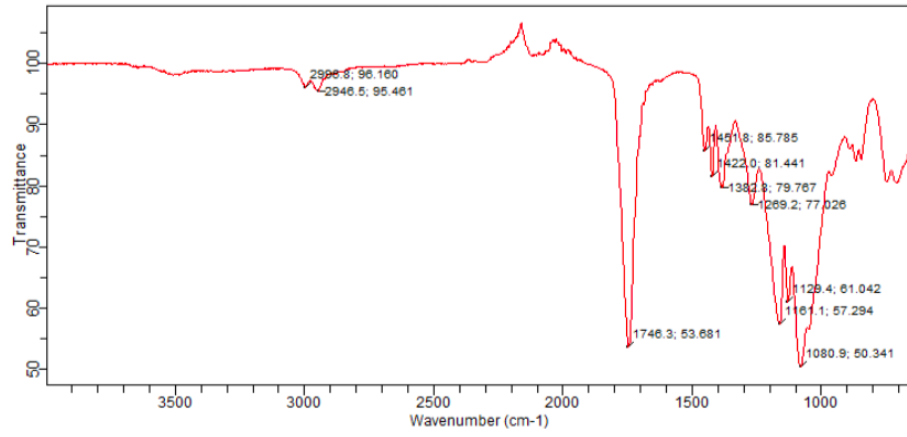
Bölüm 2.7.'de belirtilen şekilde; kitozan ve PLGA mikropartikül formülasyonlarına, kitozan termojel formülasyonlarına ve formülasyonda kullanılan yardımcı maddelere ait infared spektrumları Şekil 3.43-3.59' de verilmiştir.



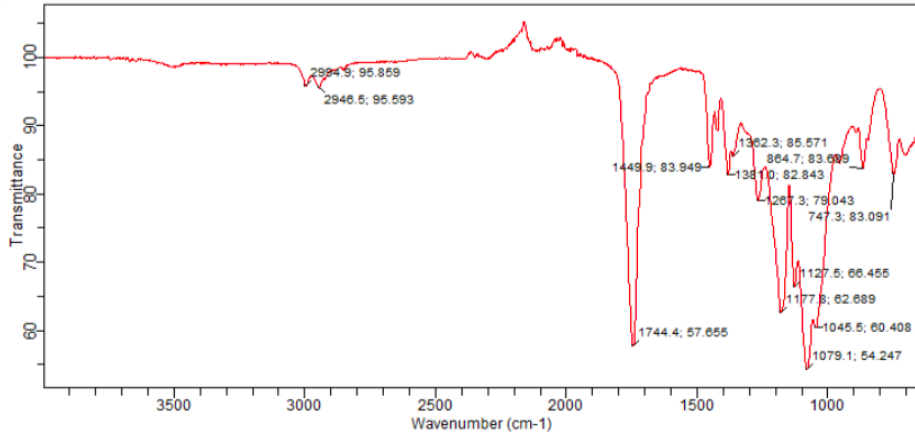
Şekil 3.43. Kitozan (MMW)'a ait FTIR spektrumu



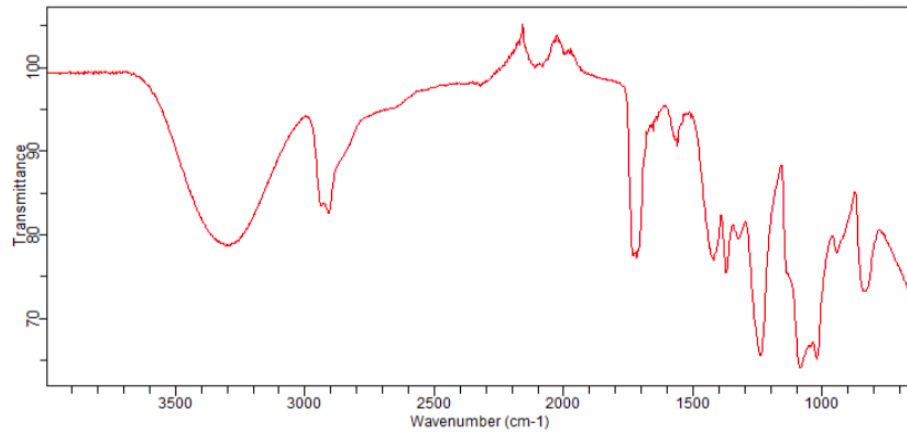
Şekil 3.44. TPP'ye ait FTIR spektrumu



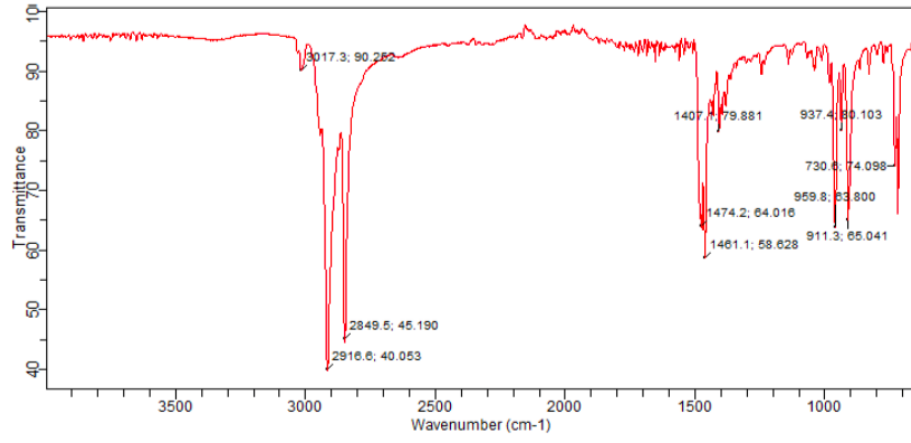
Şekil 3.45. PLGA(50:50)'ye ait FTIR spektrumu



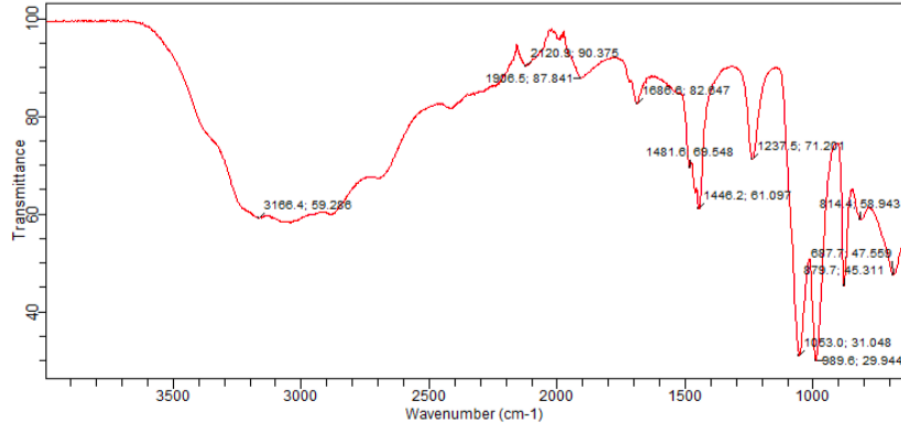
Şekil 3.46. PLGA(75:25)'ye ait FTIR spektrumu



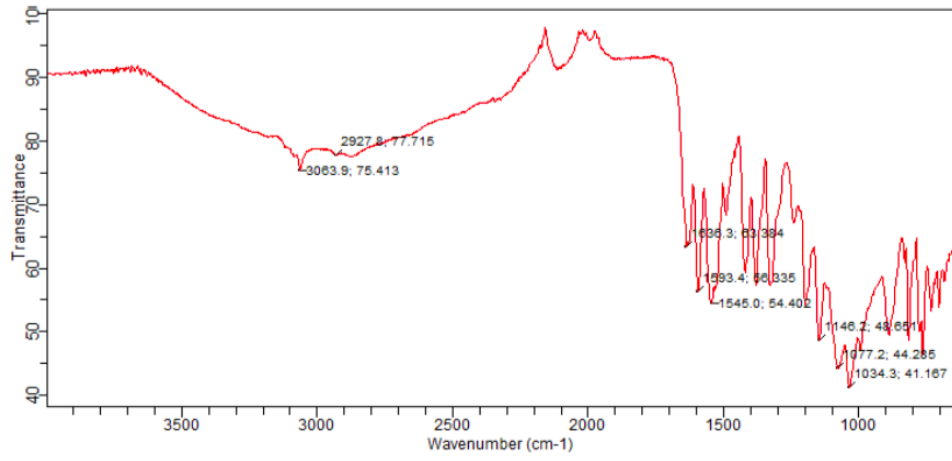
Şekil 3.47. PVA'ya ait FTIR spektrumu



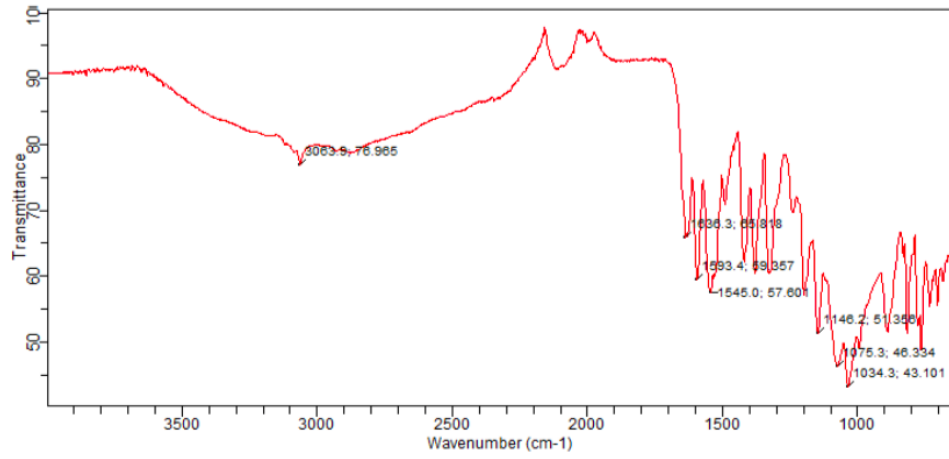
Şekil 3.48. CTAB'a ait FTIR spektrumu



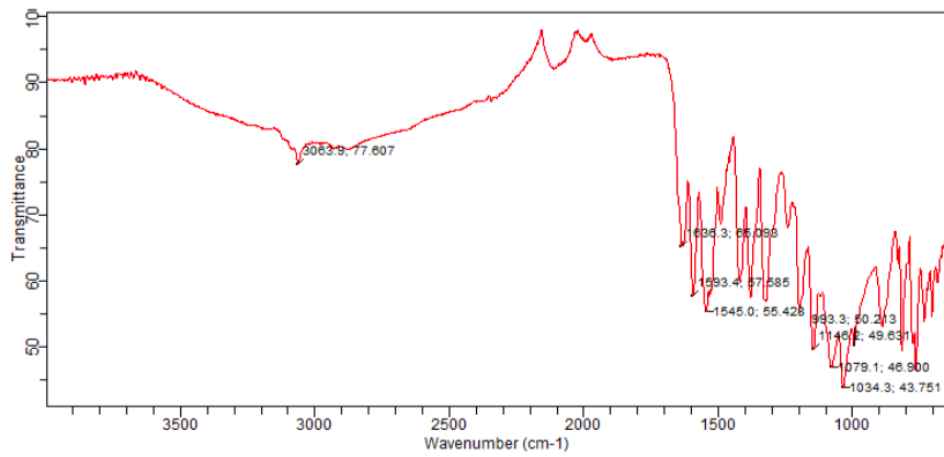
Şekil 3.49. ASP'e ait FTIR spektrumu



(a) CH8 (%1,00 TPP)

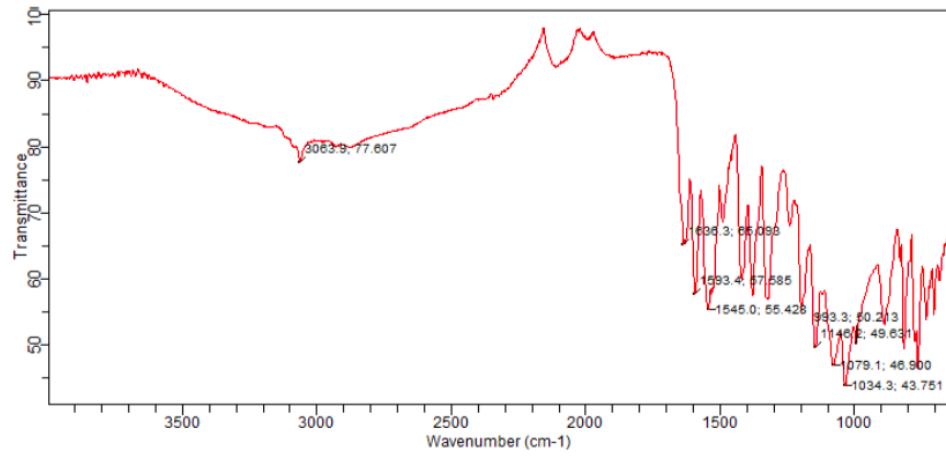


(b) CH3 (%0,75 TPP)

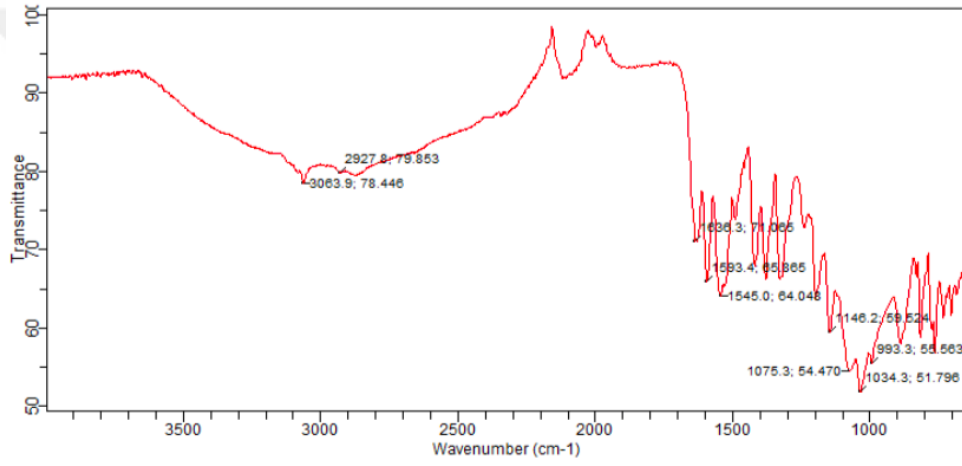


(c) CH9 (%0,50 TPP)

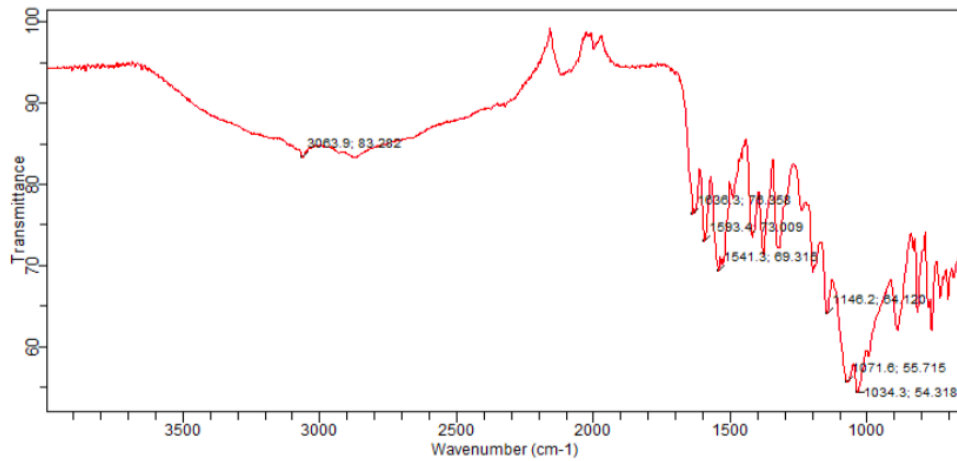
Şekil 3.50. Farklı TPP konsantrasyonlarına sahip kitozan mikropartiküllerin FTIR spektrumları



(a) CH9 (%0,2 Kitozan)

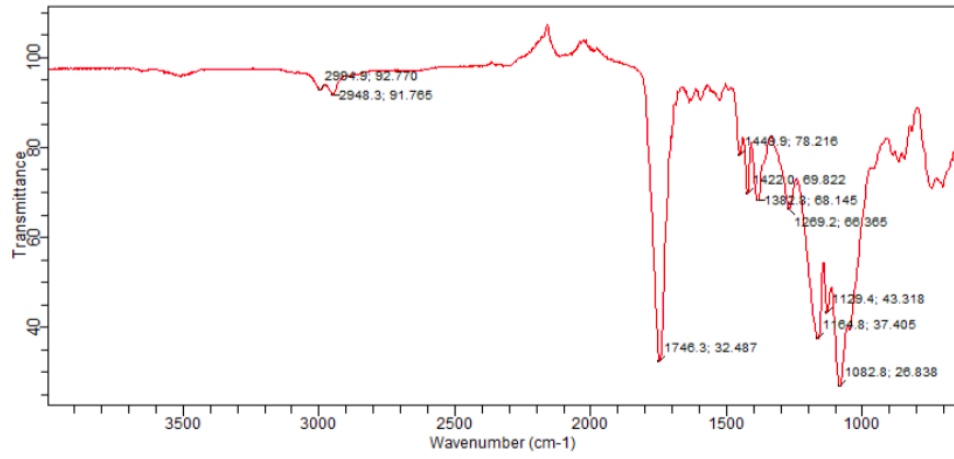


(b) CH11 (%0,3 Kitozan)

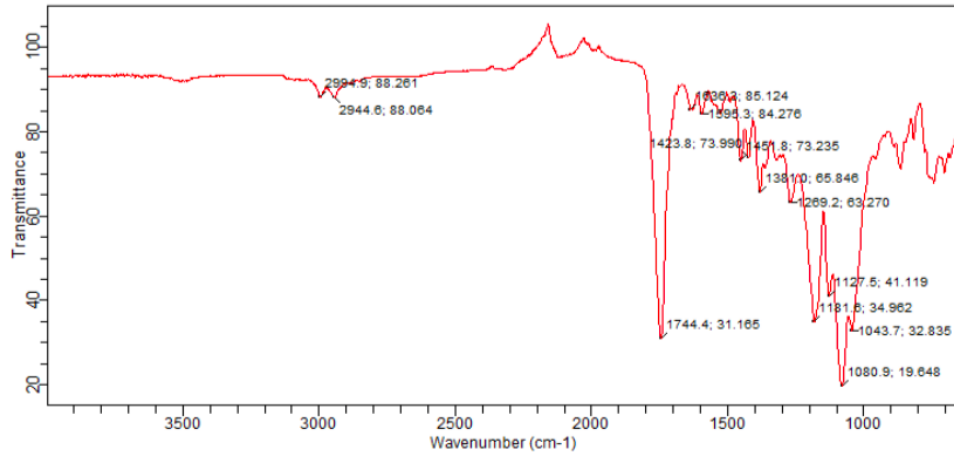


(c) CH12 (%0,4 Kitozan)

Şekil 3.51. Farklı kitozan konsantrasyonlarına sahip kitozan mikropartiküllerin FTIR spektrumları

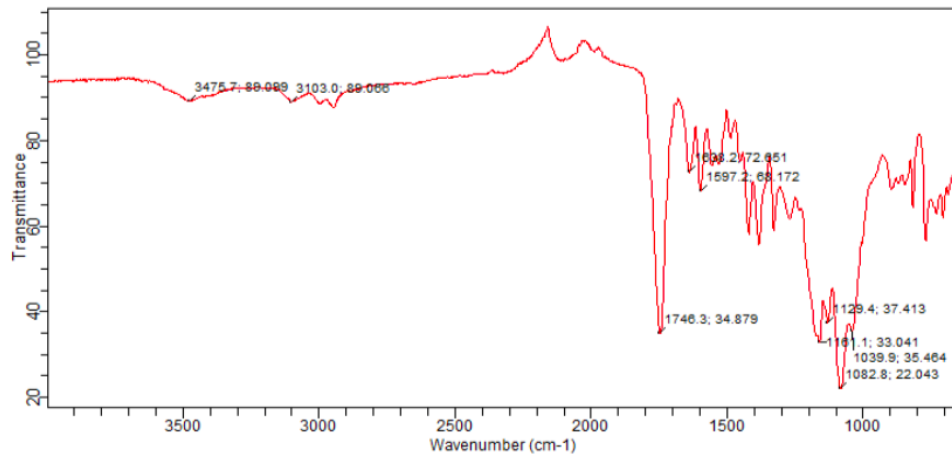


(a) P8 (PLGA 50:50)

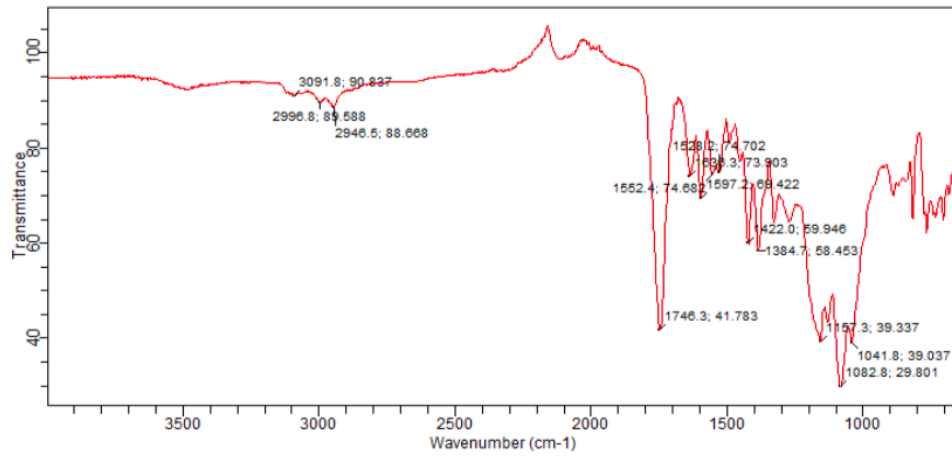


(b) P11 (PLGA 75:25)

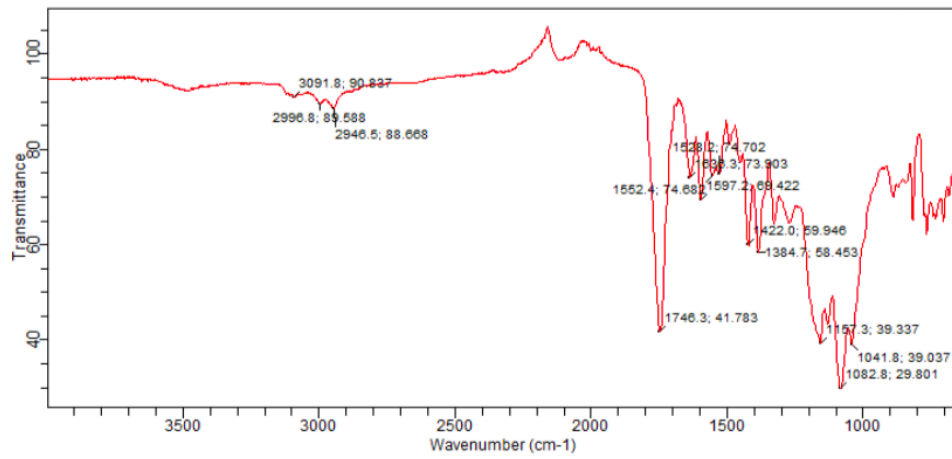
Şekil 3.52. Farklı PLGA bileşimine sahip mikropartiküllerin FTIR spektrumları



(a) P4 (%1 PLGA)

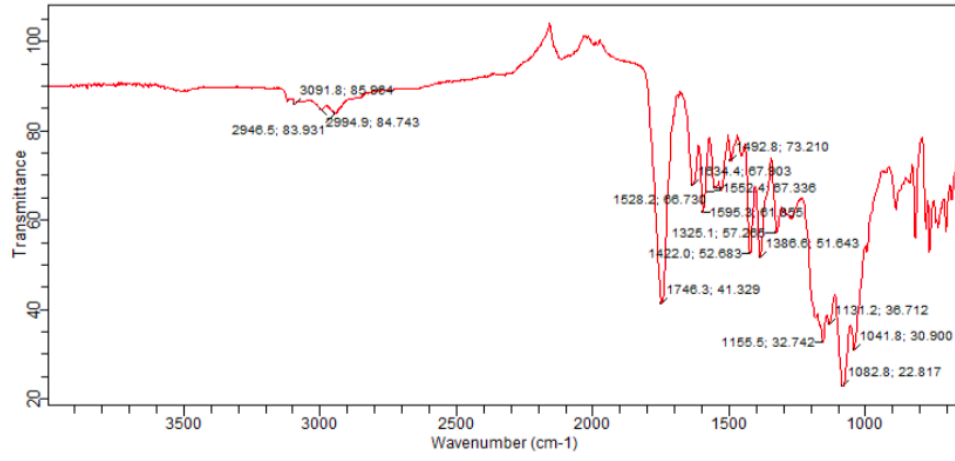


(b) P5 (%2 PLGA)

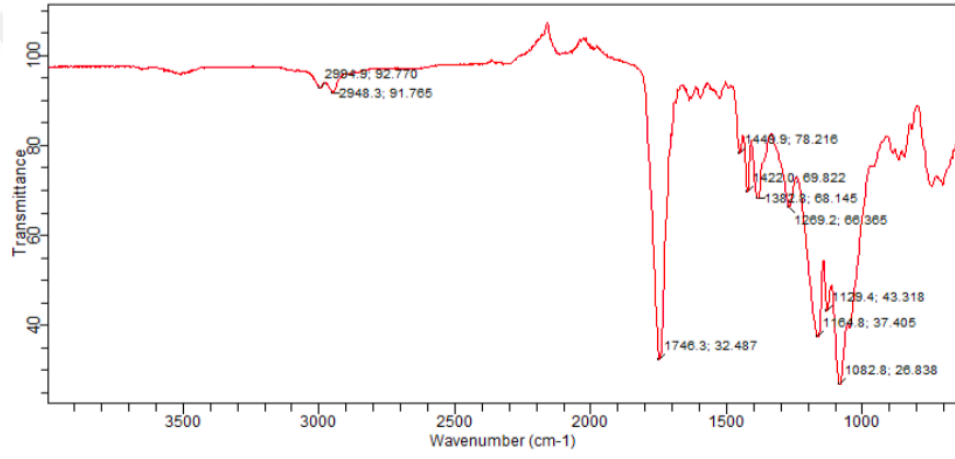


(c) P6 (%3 PLGA)

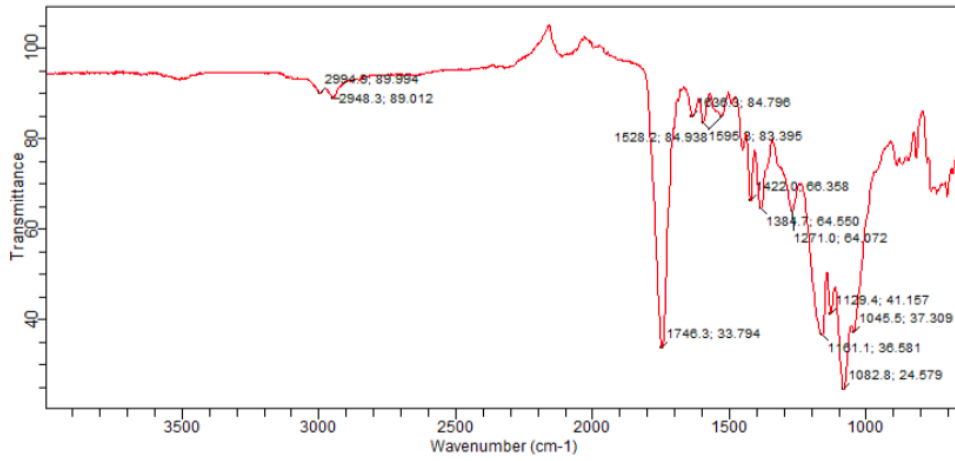
Şekil 3.53. Farklı PLGA konsantrasyonlarına sahip mikropartiküllerin FTIR spektrumları



(a) P7 (%0,5 CTAB)

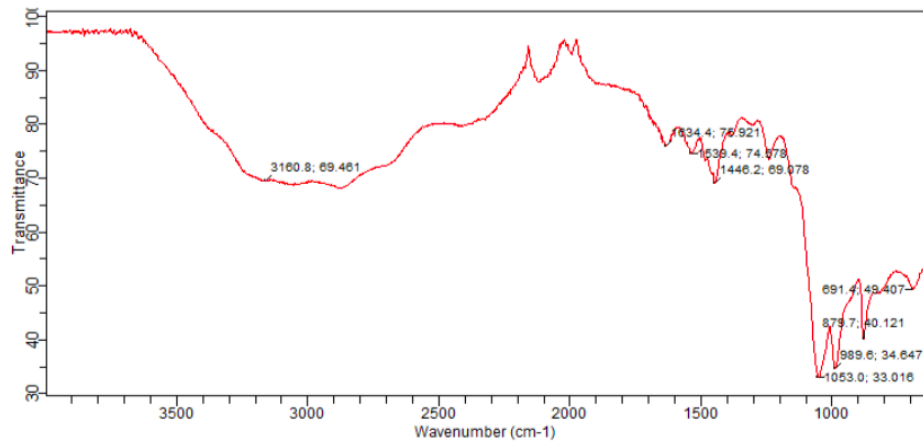


(b) P8 (%1,0 CTAB)

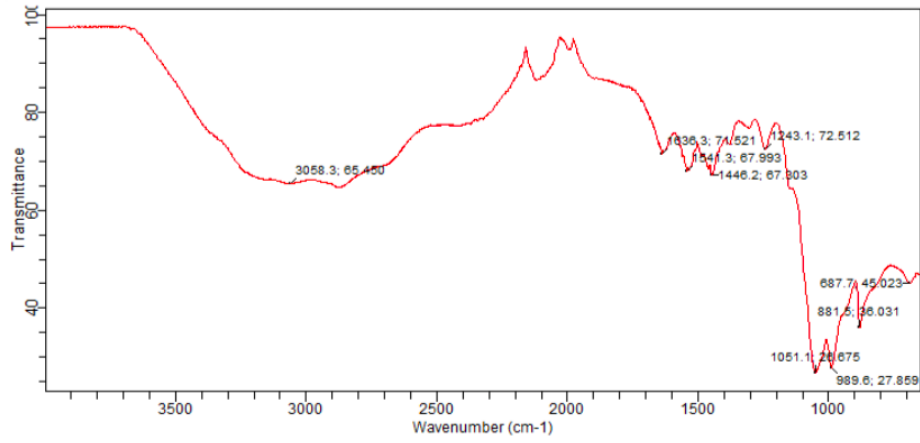


(c) P9 (%1,5 CTAB)

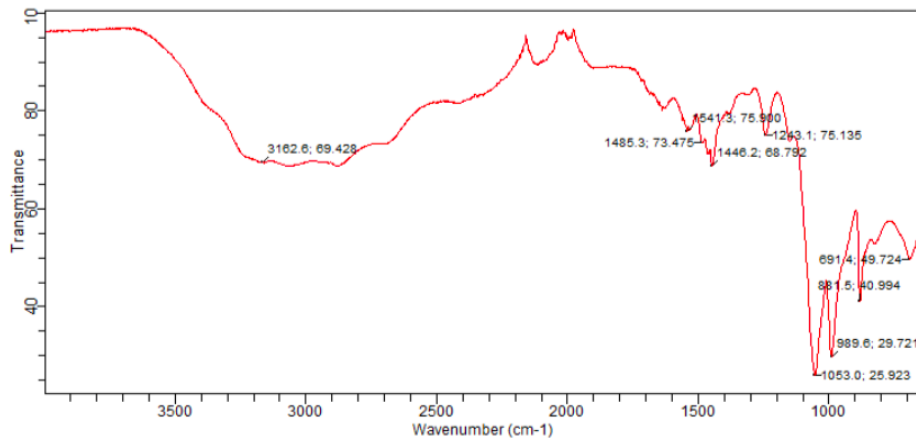
Şekil 3.54. Farklı CTAB konsantrasyonlarına sahip mikropartiküllerin FTIR spektrumları



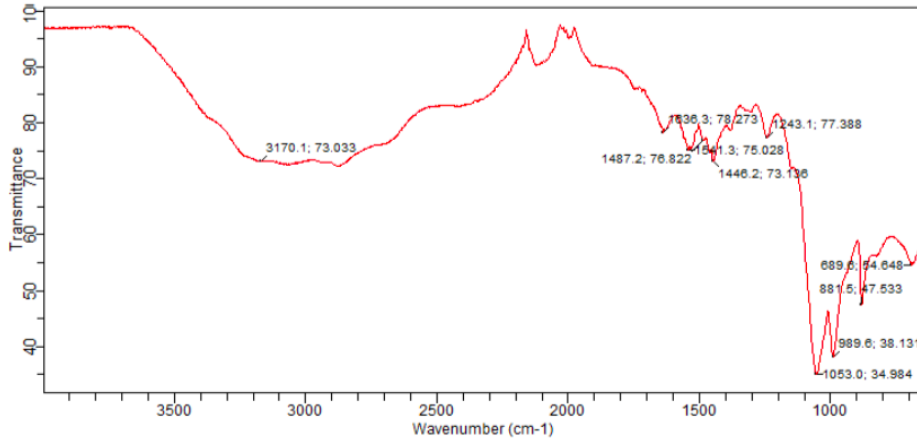
Şekil 3.55. T3 Formülasyonuna ait FTIR spektrumu



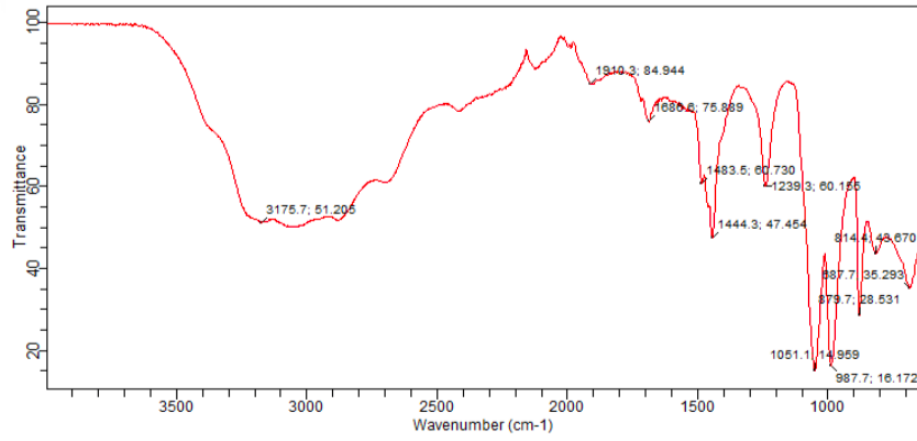
Şekil 3.56. T4 Formülasyonuna ait FTIR spektrumu



Şekil 3.57. T5 Formülasyonuna ait FTIR spektrumu



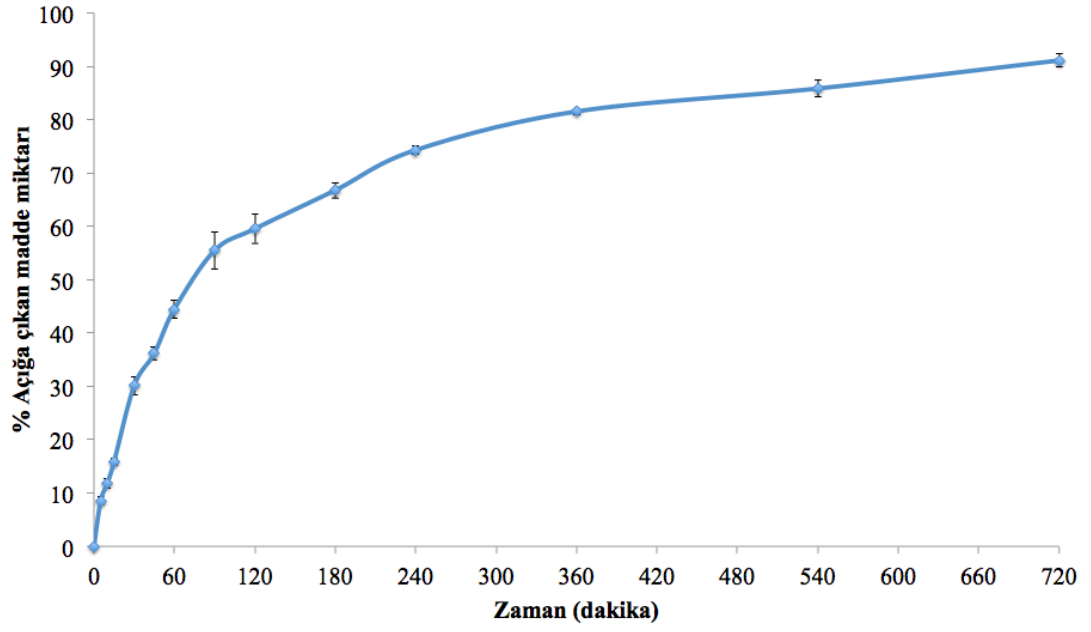
Şekil 3.58. T4-P13 kombinasyon formülasyonuna ait FTIR spektrumu



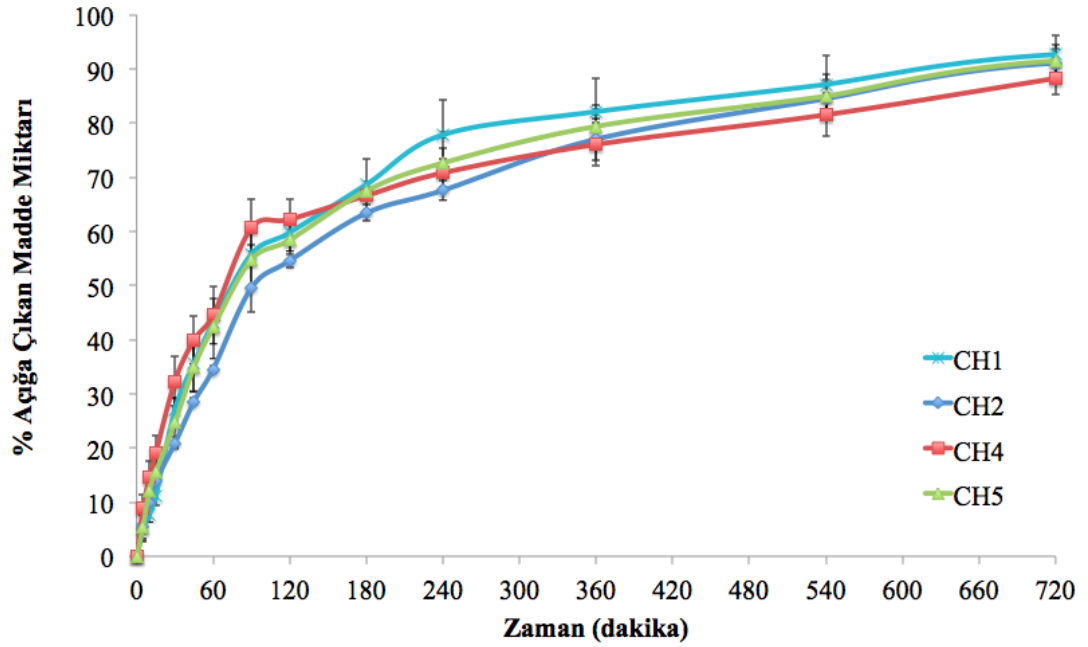
Şekil 3.59. T5-P13 kombinasyon formülasyonuna ait FTIR spektrumu

3.7. Formülasyonların Etkin Madde Çıkış Profillerine Ait Bulgular

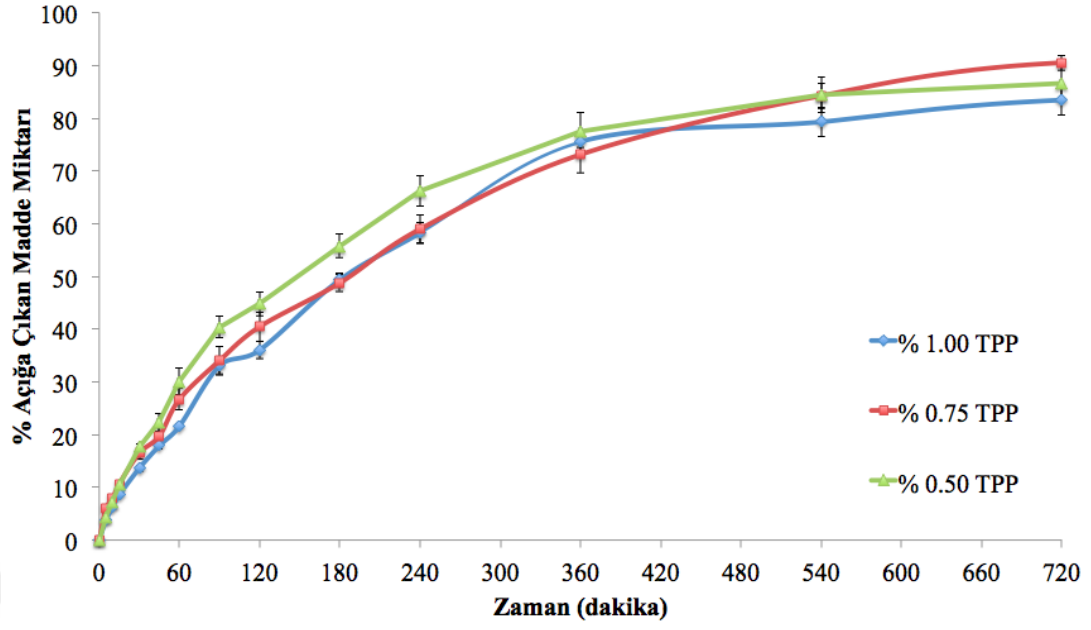
Çalışmamızda hazırlanan kitozan ve PLGA bazlı mikropartikül formülasyonları, mikropartikül/termojel kombinasyon formülasyonları ve saf etkin madde için PBS 7,4 tampon ortamında yapılan çözünme hızı tayini sonucunda zamana karşı % çıkan madde miktarları grafiğe geçirilerek elde edilen çözünme hızı profilleri düzenlenmiş ve Şekil 3.60-3.70' de verilmiştir.



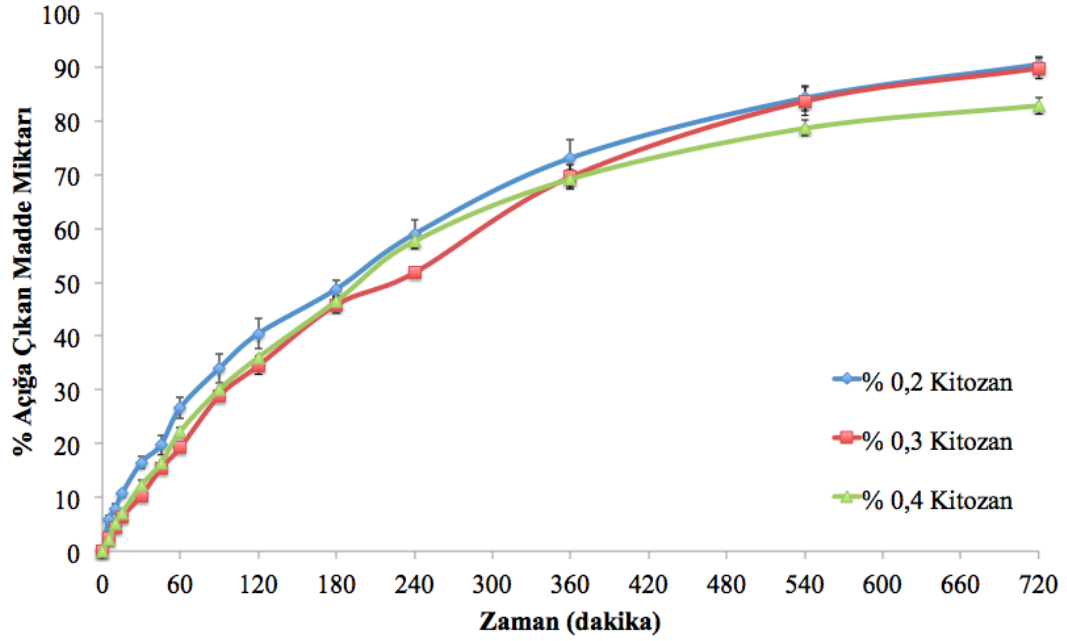
Şekil 3.60. Tenoksikamın PBS 7,4 ortamındaki çözünme hızı grafiği



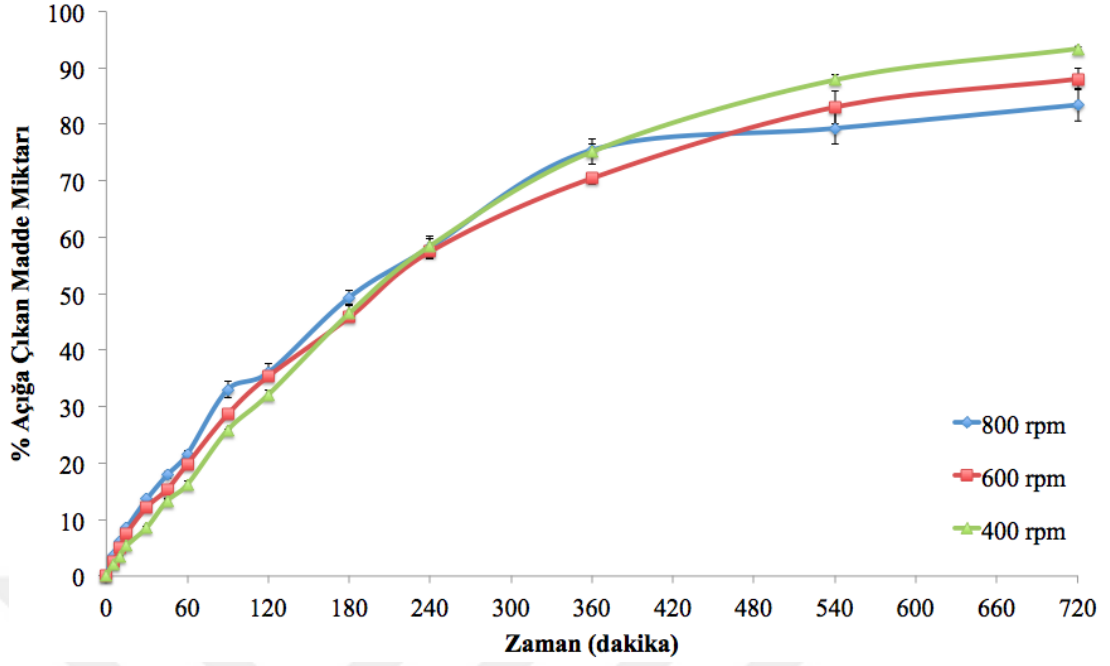
Şekil 3.61. Farklı pH ortamlarında üretilmiş kitozan bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği



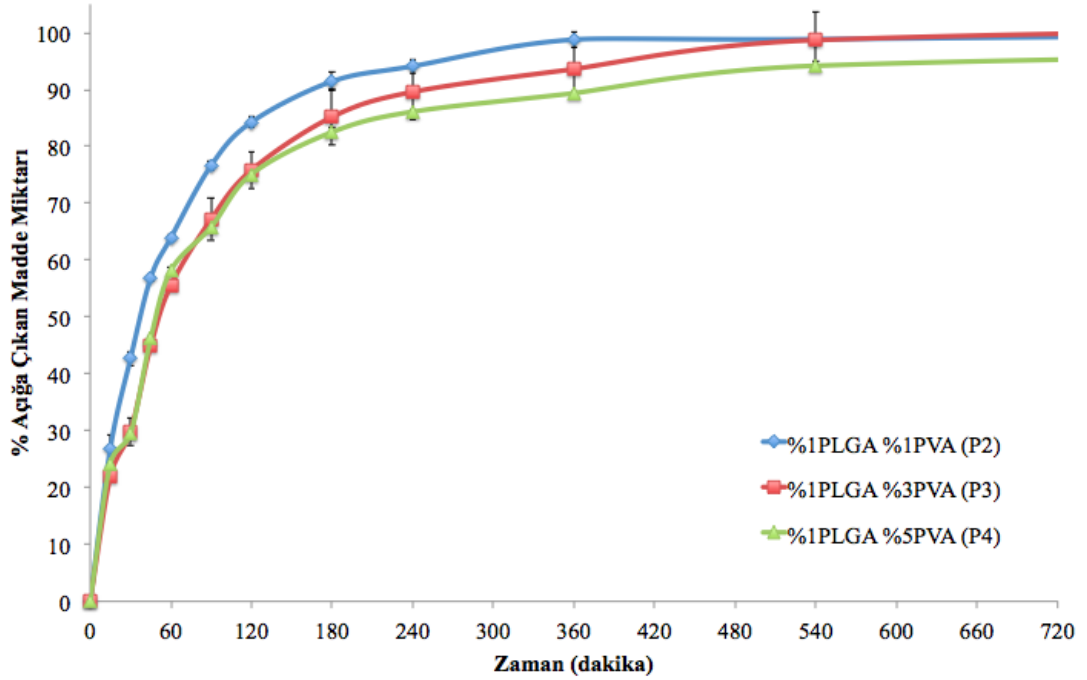
Şekil 3.62. Farklı TPP konsantrasyonlarına sahip kitozan bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği



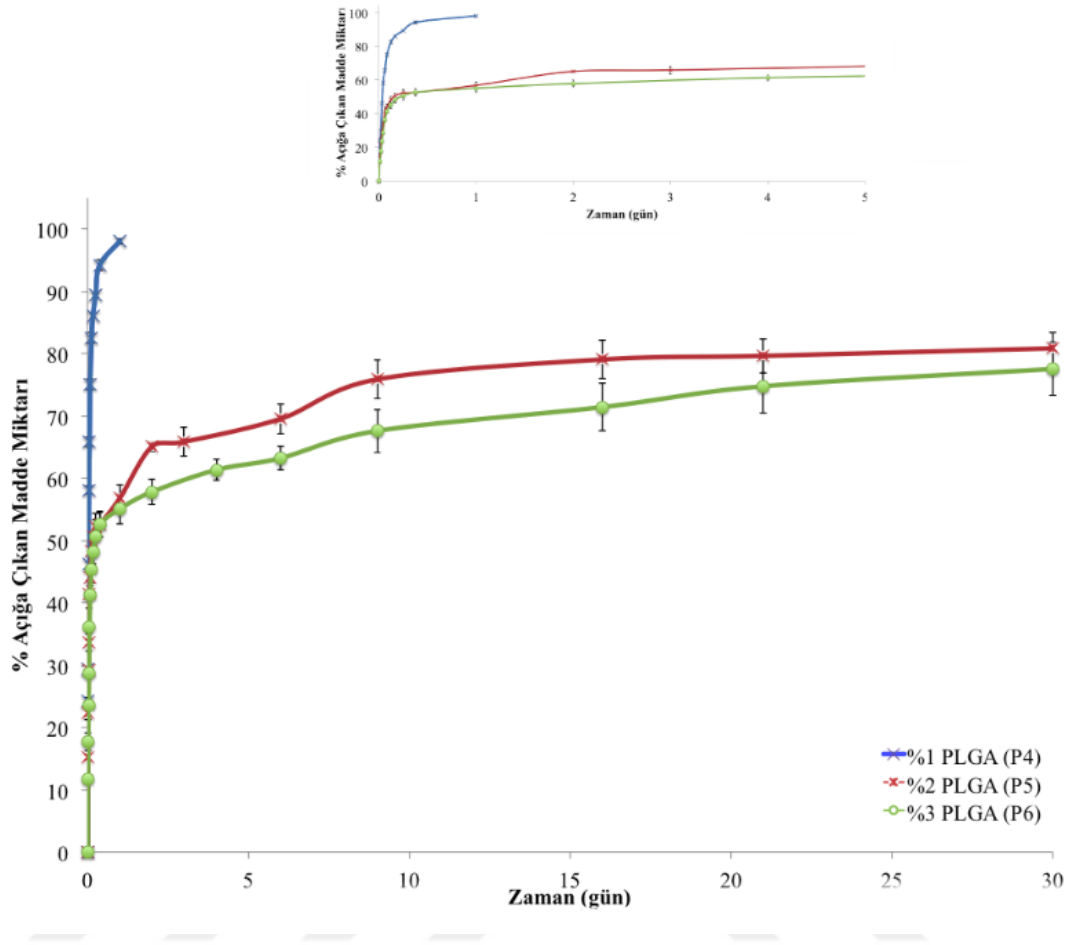
Şekil 3.63. Farklı kitozan konsantrasyonlarına sahip kitozan bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği



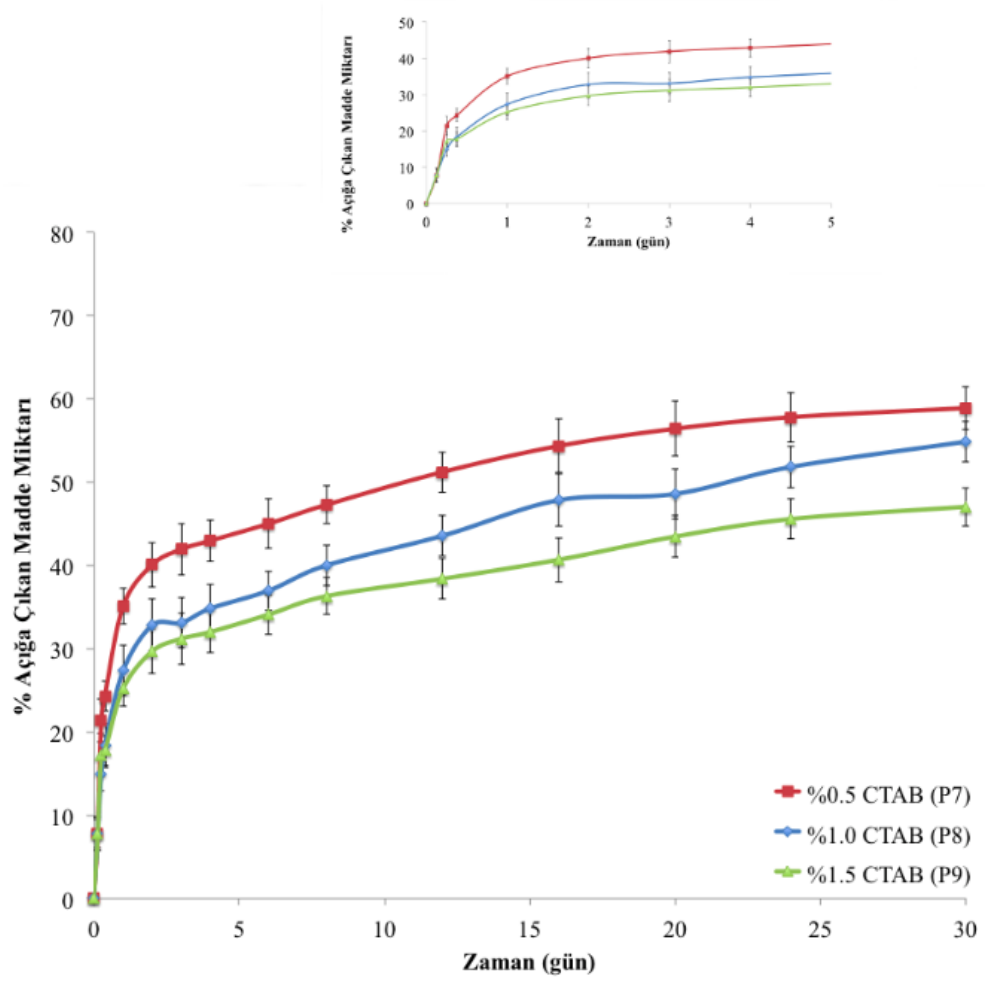
Şekil 3.64. Farklı karıştırma hızlarına sahip kitozan bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği



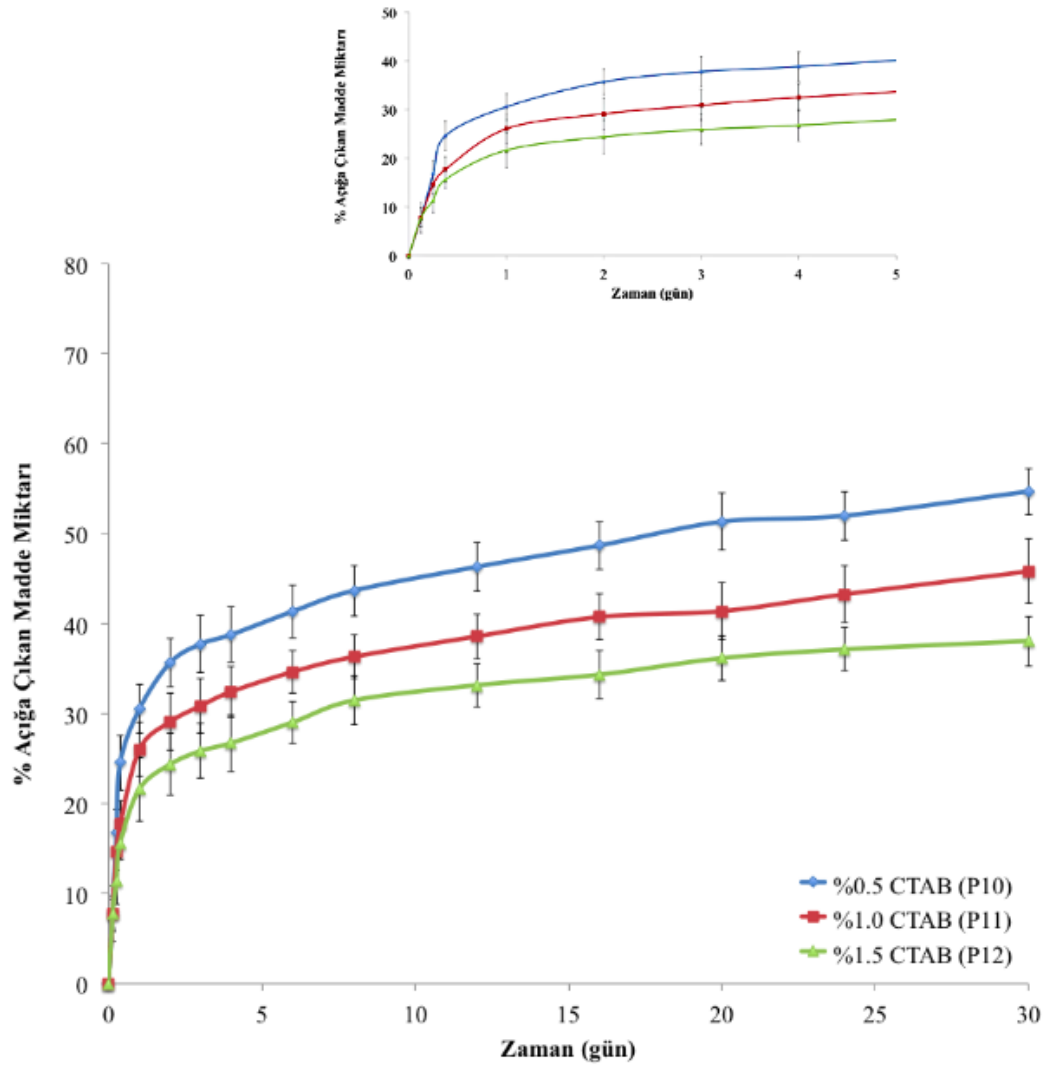
Şekil 3.65. Farklı PVA konsantrasyonlarına sahip PLGA bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği



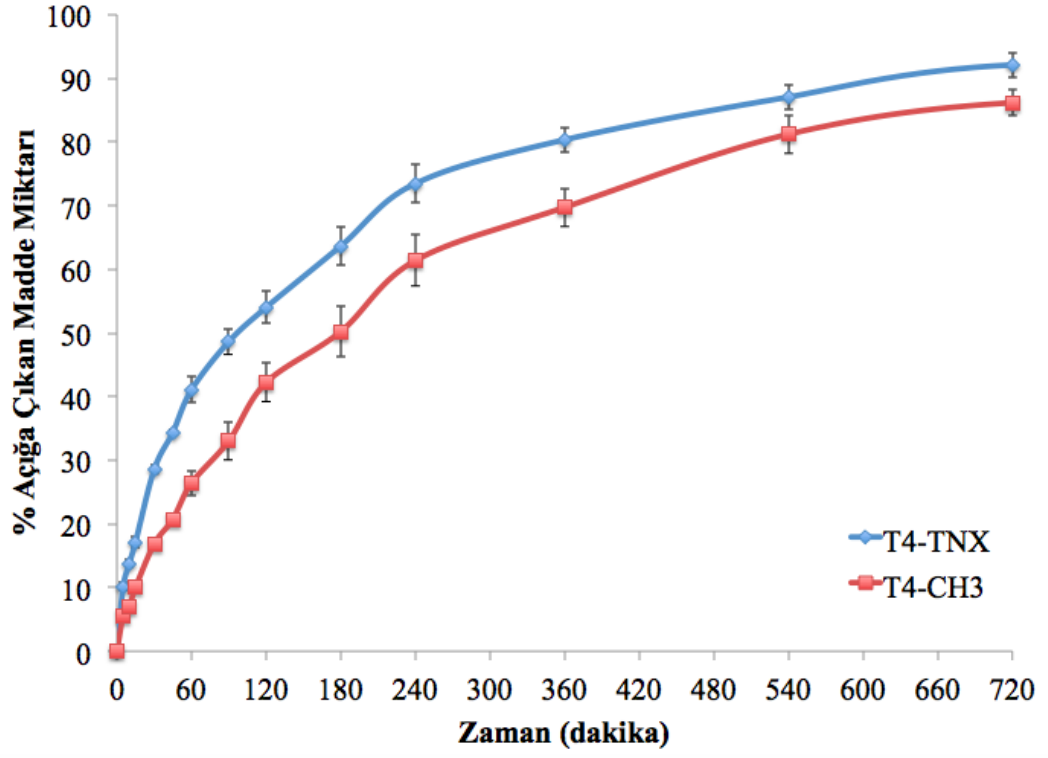
Şekil 3.66. Farklı PLGA konsantrasyonlarına sahip PLGA bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği



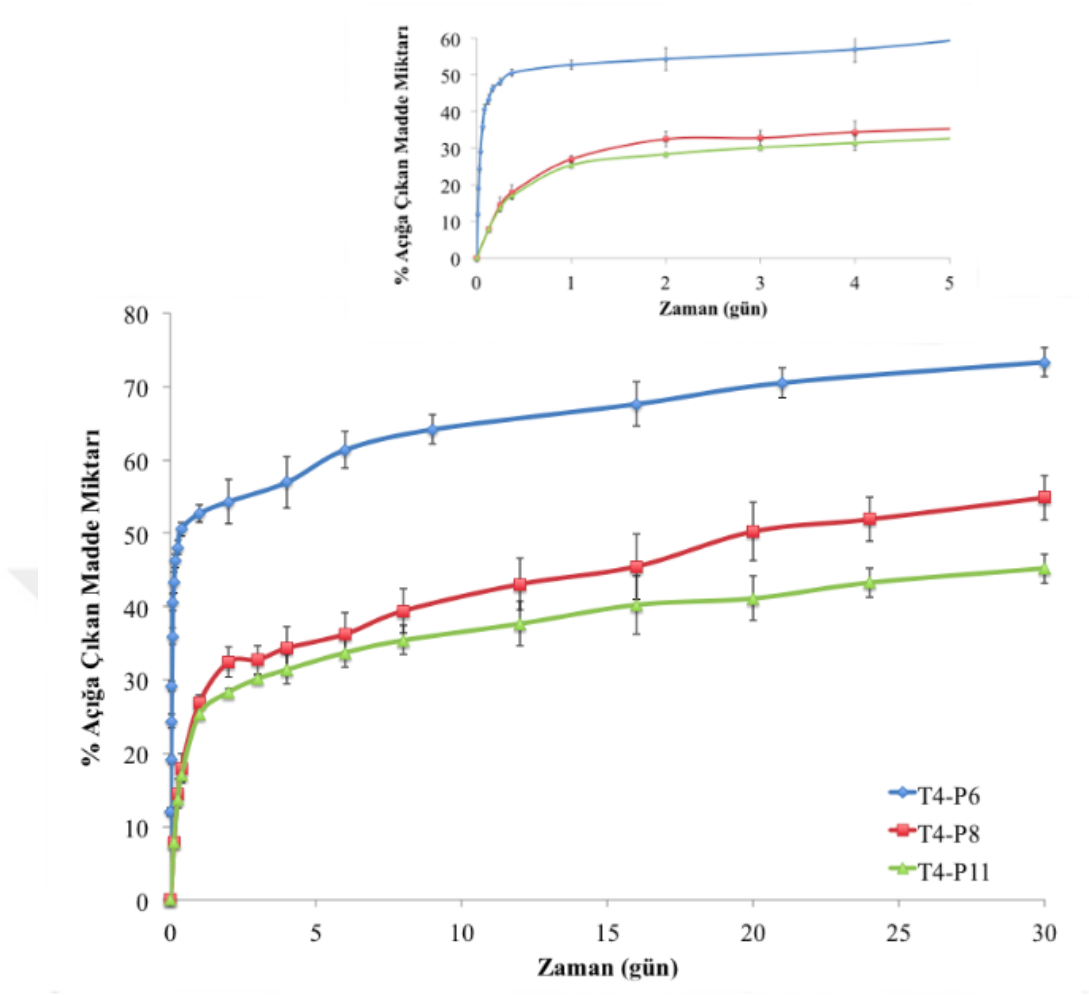
Şekil 3.67. Farklı CTAB konsantrasyonlarına sahip PLGA (50:50) bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği



Şekil 3.68. Farklı CTAB konsantrasyonlarına sahip PLGA (75:25) bazlı mikropartikül formülasyonlarından TNX çıkış grafiği



Şekil 3.69. T4-TNX karışımı ve T4-CH3 kombinasyon formülasyonundan TNX çıkış grafiği



Şekil 3.70. T4-P6, T4-P8 ve T4-P11 kombinasyon formülasyonlarından TNX çıkış grafiği

3.8. Formülasyonların Etkin Madde Çıkış Kinetiklerine Ait Bulgular

Çalışmamızda hazırlanan kitozan ve PLGA bazlı mikropartikül formülasyonları, mikropartikül/termojel kombinasyon formülasyonları ve saf etkin madde için PBS 7,4 tampon ortamında yapılan çözünme hızı tayini sonucunda birim zamanda % çıkan madde miktarları belirlenerek sıfır derece, birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell ve Korsmeyer-Peppas matematiksel modellerine uyarlanmış ve istatistiksel verileri elde edilerek Çizelge 3.19, 3.20 ve 3.21’ de verilmiştir.

Çizelge 3.19. Kitozan mikropartikül formülasyonlarına ait kinetik bulguları

Formülasyon Adı	Sıfır Derece			Birinci Derece			Higuchi			Hixson-Crowell			Korsmeyer-Peppas		
	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS
CH1	0,025	0,019	3239,39	0,918	4,155	0,001	0,907	3,572	358,202	0,966	3,025	0,001	0,326	-0,627	0,193 0,068
CH2	0,024	0,021	4112,429	0,941	4,309	0,062	0,944	3,392	186,455	0,984	3,004	0,000	0,332	-1,009	0,312 0,160
CH3	0,0222	0,022	4513,048	0,963	4,413	0,051	0,970	3,293	93,813	0,997	2,985	0,000	0,334	-0,928	0,263 0,112
CH4	0,012	0,013	3366,274	0,934	4,155	0,125	0,903	3,797	425,747	0,872	2,914	0,046	0,352	-0,784	0,251 0,095
CH5	0,025	0,019	3239,425	0,918	4,155	0,076	0,907	3,572	358,202	0,967	3,024	0,001	0,326	-0,627	0,193 0,063
CH6	0,059	0,065	5501,043	0,998	4,627	0,002	0,976	3,482	54,803	0,994	2,968	0,000	0,288	-1,273	0,362 0,237
CH7	0,077	0,073	5188,461	0,980	4,536	0,009	0,986	3,390	29,508	0,989	2,983	0,000	0,280	-1,165	0,326 0,201
CH8	0,044	0,032	4900,806	0,788	4,352	0,110	0,957	2,961	109,700	0,810	3,009	0,002	0,317	-1,051	0,287 0,145
CH9	0,029	0,025	4637,628	0,849	4,328	0,120	0,956	3,214	129,447	0,888	3,010	0,002	0,342	-1,076	0,316 0,158
CH10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH11	0,070	0,070	5223,428	0,995	4,569	0,003	0,988	3,445	26,942	0,997	2,978	0,000	0,285	-1,186	0,336 0,208
CH12	0,089	0,079	5170,254	0,956	4,515	0,014	0,986	3,278	28,819	0,969	2,987	0,000	0,276	-1,177	0,326 0,276

Çizelge 3.20. PLGA mikropartikül formülasyonlarına ait kinetik bulguları

Formülasyon Adı	Sıfır Derece			Birinci Derece			Higuchi			Hixson-Crowell			Korsmeyer-Peppas		
	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS
P1	0,013	0,013	1987,915	0,656	3,879	1,123	0,882	3,572	987,167	0,876	3,025	0,011	0,226	-0,334	0,105
P2	0,005	0,006	1655,944	0,333	2,957	2,570	0,857	3,743	975,196	0,396	3,230	0,493	0,220	-0,326	0,097
P3	0,011	0,011	2667,365	0,944	4,036	0,162	0,885	3,983	984,914	0,961	2,894	0,024	0,145	-0,404	0,104
P4	0,012	0,011	2439,516	0,754	3,776	0,302	0,866	4,048	722,029	0,873	3,077	0,007	0,142	-0,361	0,093
P5	0,059	1,437	3138,979	0,614	4,058	0,071	0,704	3,572	358,202	0,642	3,047	0,001	0,769	-0,272	0,158
P6	0,033	1,066	3188,973	0,740	4,050	0,087	0,735	21,841	861,7729	0,787	3,048	0,001	0,726	-2,67	0,204
P7	0,234	2,425	3311,505	0,706	4,276	0,025	0,908	14,000	179,177	0,726	3,019	0,000	0,526	-0,519	0,243
P8	0,257	2,761	3687,302	0,792	4,364	0,019	0,937	12,142	158,567	0,810	3,008	0,001	0,170	-0,561	0,143
P9	0,276	2,909	3905,118	0,798	4,328	0,020	0,956	11,013	129,447	0,856	3,010	0,000	0,189	-0,605	0,167
P10	0,259	2,678	3522,213	0,705	4,316	0,018	0,912	12,734	142,175	0,720	3,014	0,000	0,506	-0,555	0,239
P11	0,301	3,118	3872,389	0,690	4,374	0,011	0,914	10,561	95,127	0,698	3,006	0,000	0,451	-0,620	0,223
P12	0,329	3,441	4148,443	0,682	4,414	0,007	0,916	8,971	66,492	0,695	3,001	0,000	0,395	-0,678	0,211

Çizelge 3.21. Mikropartikül/Termojel kombinasyon formülasyonlarına ait kinetik bulgular

Formülasyon Adı	Sıfır Derece			Birinci Derece			Higuchi			Hixson-Crowell			Korsmeyer-Peppas		
	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS	r ²	k	RMS
T4-TNX	0,027	0,021	3674,175	0,874	4,201	0,098	0,933	3,443	232,661	0,928	3,024	0,001	0,331	-0,736	0,211
T4-CH3	0,025	0,023	4461,483	0,885	4,335	0,110	0,962	3,274	115,412	0,926	3,007	0,110	0,333	-0,922	0,261
T4-P6	0,072	1,653	3377,304	0,633	4,112	0,054	0,709	18,911	736,745	0,663	3,040	0,001	0,704	-0,303	0,171
T4-P8	0,263	2,813	3816,542	0,792	4,369	0,120	0,935	11,889	88,540	0,809	3,007	0,000	0,520	-0,601	0,250
T4-P11	0,301	3,118	3877,114	0,692	4,375	0,011	0,911	10,587	98,182	0,707	3,006	0,000	0,450	-0,620	0,223

3.9. Formülasyonların Ön Stabilite İncelemesine Ait Bulgular

Çalışmamızda hazırlanan kitozan ve PLGA bazlı mikropartiküllerin önstabilite incelemeleri 3 ay süreyle karanlık ortam koşullarında +25 °C’de % 60 bağıl nem içeren, +40 °C’ de % 75 bağıl nem içeren ve +4 °C’ de buzdolabı ortamlarında incelenmiş ve 0. ile 3. ay sonuçları karşılaştırılarak mikropartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, partikül büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak Çizelge 3.22 ve 3.23’ de verilmiştir.

Γ

Γ



Çizelge 3.22. Mikropartikül formülasyonlarının ön stabilite incelemelerine ait zeta potansiyeli değerlerine ait bulgular

	0. AY	3. AY (+4 °C)	3. AY (+25 °C)	3. AY (+40 °C)
Formülasyon	Zeta Potansiyeli	Zeta Potansiyeli	Zeta Potansiyeli	Zeta Potansiyeli
Adı	(mV±SS, n=5)	(mV±SS, n=5)	(mV±SS, n=5)	(mV±SS, n=5)
CH1	10,72±1,15	1,23±0,45	1,20±0,53	41,56±0,61
CH2	13,28±0,42	1,54±0,21	1,60±0,31	45,03±0,58
CH3	9,56±0,59	1,17±0,32	1,22±0,25	43,21±0,62
CH4	14,38±0,46	1,60±0,54	1,68±0,46	40,32±0,37
CH5	14,44±0,62	1,58±0,34	1,60±0,52	42,56±0,45
CH6	9,67±0,66	0,15±0,03	0,16±0,06	44,14±0,67
CH7	8,20±0,24	0,14±0,04	0,14±0,03	36,98±0,54
CH8	11,68±0,89	1,46±0,42	1,53±0,46	38,67±0,87
CH9	9,16±0,33	0,15±0,05	0,15±0,04	43,44±0,33
CH11	10,30±0,73	1,23±0,23	1,24±0,37	38,54±0,65
CH12	15,00±0,53	1,73±0,43	1,80±0,58	41,42±0,52
P1	13,75±1,63	13,22±0,86	8,90±1,34	8,875±0,98
P2	20,26±0,69	20,02±0,74	19,82±0,86	14,41±0,78
P3	17,80±1,52	16,60±1,01	16,53±1,74	12,57±1,04
P4	16,02±0,49	15,74±0,52	10,21±1,29	10,94±0,79
P5	18,34±0,69	18,04±0,55	17,77±0,84	11,84±0,53
P6	15,00±0,62	14,73±0,42	14,72±0,73	9,87±0,82
P7	14,16±0,72	13,54±0,65	8,30±0,56	9,67±1,34
P8	31,30±2,26	31,03±1,04	30,67±2,35	22,30±1,67
P9	32,92±1,24	32,55±0,98	32,42±1,36	23,88±1,69
P10	12,84±0,69	12,56±0,74	7,30±0,78	8,94±0,53
P11	30,04±1,97	29,78±1,43	29,54±1,56	20,23±2,07
P12	32,22±0,78	32,01±0,65	31,69±0,97	24,52±1,23

Çizelge 3.23. Mikropartikül formülasyonlarının ön stabilite incelemelerine ait partikül büyüklüğü ve dağılımlarına ait bulgular

0. AY		3. AY (+4 °C)		3. AY (+25 °C)		3. AY (+40 °C)	
Formülasyon	Partikül Boyutu	SPAN	Partikül Boyutu	SPAN	Partikül Boyutu	SPAN	Partikül Boyutu
Adı	($\mu\text{m}\pm\text{SS}$)		($\mu\text{m}\pm\text{SS}$)		($\mu\text{m}\pm\text{SS}$)		($\mu\text{m}\pm\text{SS}$)
CH1	74,60±8,67	2.52	185,43±7,43	3.01	189,55±4,47	2.65	54,23±3,45
CH2	99,97±0,25	2.32	243,04±2,34	3.12	253,27±2,23	2.54	73,13±1,76
CH3	59,57±3,15	2.07	111,32±3,75	2.86	59,57±3,15	2.24	31,53±3,01
CH4	81,13±1,66	2.17	109,44±1,92	2.99	115,54±1,89	2.33	60,21±1,43
CH5	183,7±15,5	3.15	341,7±17,88	3.15	354,63±10,33	3.34	153,12±9,32
CH6	54,67±2,52	3.52	74,60±2,84	3.89	80,22±2,87	3.65	27,40±1,34
CH7	59,17±2,80	2.48	123,56±2,30	2.79	131,22±2,98	2.44	35,67±3,34
CH8	49,50±1,51	2.38	74,50±1,99	2.97	78,82±1,51	2.37	33,53±1,76
CH9	64,83±4,39	5.12	216,33±4,22	6.01	218,99±4,43	5.34	42,34±5,87
CH11	85,57±11,56	5.14	316,45±5,95	5.89	322,76±10,34	5.25	75,33±6,54
CH12	106,67±4,04	3.4	407,33±5,63	4.12	415,67±4,32	3.4	87,64±5,12
P1	84,70±0,95	1.15	85,62±0,81	1.13	98,90±0,87	1.77	143,65±3,45
P2	17,83±0,47	1.11	18,34±0,53	1.11	29,93±0,74	1.64	82,03±1,31
P3	13,40±0,10	1.42	13,87±0,46	1.37	30,43±0,35	1.72	70,74±0,89
P4	09,27±0,11	1.73	09,07±0,26	1.85	20,17±0,31	2.16	57,81±0,93
P5	11,43±0,15	1.44	11,78±0,31	1.46	29,41±0,51	1.95	61,24±0,83
P6	14,73±0,74	2.06	15,01±0,42	2.11	30,25±0,58	2.82	78,46±1,53
P7	31,43±1,53	4.85	31,73±0,99	4.78	41,24±1,03	5.35	105,44±2,13
P8	12,37±0,40	2.96	12,68±0,57	3.03	12,82±0,44	2.85	70,36±1,03
P9	32,70±0,96	2.45	33,14±0,85	2.57	32,96±1,03	2.61	105,97±1,28
P10	71,67±1,53	3.06	72,15±1,49	3.15	87,96±1,37	3.06	157,54±1,76
P11	12,13±0,21	2.29	12,30±0,43	2.33	12,44±0,40	2.38	76,33±0,87
P12	92,33±2,52	3.23	93,57±2,05	3.32	93,76±2,28	3.35	203,41±2,75

4. TARTIŞMA

4.1. Tenoksikamın Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Etkin maddenin PBS 7,4 tampon çözeltisi ile hazırlanan örneklerinden UV spektrumu alındığında maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu 367,97 nm olarak saptanmıştır ve literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (Negi ve ark., 2013; Nesseem ve ark., 2011) . Aynı şekilde etkin maddenin DCM ile hazırlanmış çözeltilerinin UV spektrumu alındığında maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu 345,14 nm olarak saptanmış ve literatür ile uyumlu bulunmuştur (Banerjee ve ark., 2003; Ramírez-Silva ve ark., 2013). Çalışmamızda tenoksikam içeren tüm numunelerin analizleri bu dalga boylarında yapılmıştır.

Etkin maddenin PBS 7.4 tamponu ve DCM ortamlarındaki kalibrasyon denklemlerine bakıldığında determinasyon katsayıları sırasıyla 0,9994 ve 0,9996 olarak elde edilmiş ve bu değerler 1'e yakın olduğu için ölçülen absorbands ile çözelti konsantrasyonları arasındaki ilişkinin güvenilir olduğunu ve doğrusal bir ilişkinin varlığını göstermektedir.

Seçilen analitik yönteminin validasyonunun değerlendirilmesi amacıyla seçicilik, doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik, seçicilik, teşhis ve tayin sınırı parametreleri incelenmiştir. Tenoksikamın analitik validasyonu için incelenen doğruluk ve kesinlik parametreleri sonucunda elde edilen verilere ait bağıl sapma değerlerinin her iki ortamda da % 2' nin altında olması kalibrasyon denkleminin doğru ve kesin sonuçlar verdiğini göstermiştir. UV spektrometresinde etkin maddenin ve diğer yardımcı maddelerin absorbands piklerinin kesişmediğinin görülmesi, seçiciliğin iki ortam için de geçerli olduğunu göstermiştir. Son olarak LOD ve LOQ değerlerinin kalibrasyon saptanmasında kullanılan en küçük değer olan 2 µg/ml' den az olması kalibrasyonun etkin maddenin tayin edilebildiği aralıkta olduğunu göstermiştir. Yöntemin tekrar edilebilirliği testinde ise istatistiksel inceleme sonucu $p > 0,05$ bulunmuş, farklı günlerde yapılan ölçümler arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Yöntem validasyonuna ait verilerin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olması tenoksikamın bu kalibrasyonu sonucu başarılı bir şekilde analiz edilebileceğini

göstermektedir.

Tenoksikamın termal incelemesi yapıldığında DSC termogramında 223,26 °C' de keskin bir endotermik pik ve 232,48 °C'de de keskin bir ekzotermik pik görülmüştür. Etkin maddenin DSC termogramı hakkında bilgi veren çeşitli literatürler bu açıdan incelendiğinde El-Gazayerly ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada (2000) tenoksikamın 221 °C ' de endotermik pik ve 224 ° C'de ekzotermik pikin yer aldığı belirtilmiştir. Negi ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise 213 °C' de endotermik pik ve 224 °C' de ekzotermik pik görülmüştür (2013). Benzer şekilde Alladi ve Shastri' nin yapmış olduğu çalışmada 215 °C' de endotermik pik ve takiben ekzotermik bir pik elde edilmiştir (2015). Tüm bu çalışmalar gözlenen endotermik pikin tenoksikamın erime noktası, ardından gelen ekzotermik pikin ise degradasyon piki olduğunu kanıtlamaktadır.

FTIR spektroskopisi yöntemiyle kimyasal maddelerin moleküler yapılarının tayini yapılabilmektedir. Tenoksikamın yapısının aydınlatılması için bu parametre incelenmiştir. Alladi ve Shastri tenoksikama ait elde etmiş oldukları spektrumda 3429, 3119 ve 3092 cm^{-1} ' de O-H ve N-H gerilmesine bağlı pikler görülmüştür. Ayrıca 1635, 1598 ve 1530 cm^{-1} ' de C=O ve C=N gerilmelerine bağlı pikler bulunmuştur (2015). Nesseem ve arkadaşlarını yapmış olduğu çalışmada ise benzer bir şekilde 3450 cm^{-1} ' de O-H, 3100 cm^{-1} ' de N-H ve 1637 cm^{-1} ' de C=O gerilmesine ve 1539 cm^{-1} ' de N-H bükülmesine bağlı pikler görülmüştür (2011). Zayed ve arkadaşları ise yapmış oldukları çalışmada tenoksikamın farklı tuz formlarının FTIR analizlerini yapmışlar ve O-H ve N-H gerilmesine bağlı oluşan piklerin % transmittanslarında değişimler olduğu görülmüştür. Örneğin tenoksikamın kobalt tuzunda 3000-3400 bantlarında çok düşük oranda transmittans görülmüştür (2007). Bunun nedeninin tuz oluşumu sırasında hidrojen atomlarının kaybı ile O-H ve N-H gerilmelerindeki azalama olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda tenoksikama ait FTIR spektrumunda 3063 cm^{-1} ' de, 1636 cm^{-1} ' de 1593 cm^{-1} ' de ve 1545 cm^{-1} ' de spesifik pikler görülmüştür. 3063 cm^{-1} ' de görülen pikin N-H, 1500-1650 cm^{-1} bantlarında görülen piklerin ise C=O ve C=N gerilmelerinden olduğu düşünülmektedir. Elde edilen veriler etkin maddenin açık kimyasal formülü ile karşılaştırıldığında, etkin maddenin açık kimyasal formülünde görülen belirleyici kimyasal grupları ifade eden absorpsiyon bantlarının elde ettiğimiz FTIR spektrumunda yer aldığı saptanmıştır.

Etkin maddenin çözünürlüğü ile ilgili yapılan çalışmaya gelindiğinde literatür incelemesi yapılarak BP 2000, EP 6 gibi farmakopelerde ve Martindale 36 gibi kaynak kitaplarda tenoksikamın pratik olarak suda çözünmediği, asidik ve bazik ortamlarda çözündüğü ve diklorometanda ise az çözündüğü bulunmuştur. İn vitro çözünme hızı çalışmaları boyunca ortamdaki sink koşulunun varlığını sağlamak için çalışmamızda etkin maddenin PBS 7,4 tamponu içindeki çözünürlük değeri hesaplanmış ve bu değer 1,258 mg/ml olarak bulunmuştur. Çözünme hızı testi boyunca sink koşulunun sağlanması için 100 ml ortam hacminde çalışılmıştır. Etkin maddenin DCM’ deki çözünürlüğü ise 524,09 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

Etkin madde üzerinde yapılan literatür çalışmasında etkin maddenin ışık altında bozulduğu çeşitli farmakope ve kaynak kitaplarda yer almaktadır (Martindale 36, BP 2000, EP 6). Centre ve Hobbs, tenoksikam için uygun bir analiz yöntemi geliştirmek için yapmış oldukları çalışmada ışık etkisini incelemişler ve 1 ml plazma sıvısına 1 µg/ml tenoksikam koyarak normal laboratuvar koşulları altında incelediklerinde 3 saat içerisinde tenoksikamın % 43’ ünün bozulduğu tespit etmişlerdir (1995). Yapılan başka bir çalışmada tenoksikam ışık altındaki degradasyonunun pH, solvent türü, ortam sıcaklığı ve oksijen gazı varlığı gibi bir çok parametreden etkilendiği belirtilmiştir. Özellikle pH’nın etkisi incelendiğinde pH 4 ve 10’ a oranla nötr pH’da bozunma hızının arttığı görülmüştür. (Mahmoud ve ark., 2000). En hızlı bozunmanın pH 7’de olduğu ve geliştirilen formülasyonun eklem içine verileceği göz önüne alınarak pH 7,4’te stabilite incelemesi yapılmıştır. Yapılan üç aylık stabilite çalışmasında +4, +25 ve +40 °C olmak üzere farklı sıcaklık koşullarında karanlık ortamda etkin maddenin üç ay sonucunda konsantrasyonunda önemli bir değişiklik olmadığı ancak gün ışığı altında incelenen grupta üç ayın sonunda etkin maddenin tamamen bozulduğu görülmüştür. Yapılan bu stabilite çalışması sonucunda tenoksikamın ışık altında bozulduğu saptanmış ve laboratuvar çalışma koşulları bu durum göz önüne alınarak değiştirilmiş ve etkin maddenin kullanıldığı durumlarda karanlık altında çalışılmıştır. Çözünme hızı testi süresince 37 °C’ de etkin maddenin stabil kalıp kalmadığının belirlenmesi amacıyla da kısa süreli stabilite testleri uygulanmış ve tenoksikamın 37 °C’ de 48 saat boyunca stabil kaldığı belirlenmiştir.

4.2. Formülasyonlarının Hazırlanmasına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda; osteoartrit tedavisinde kullanılmak üzere tenoksikamın doğrudan ilgili eklemden salımını gerçekleştirmek amacıyla mikropartikül/termojel kombinasyon sistemlerinin hazırlanması planlanmıştır. Çalışmamızın başında öncelikle polimerik bazlı mikropartikül formülasyonları geliştirilmiş, daha sonra termojel formülasyonları hazırlanmıştır. Çalışmanın devamında hedeflenen karakterizasyon özelliklerini sağlayan mikropartikül formülasyonları seçilerek, uygun termojel formülasyonunda homojenize edilerek mikropartikül/termojel kombinasyon sistemleri hazırlanmıştır.

Mikropartikül hazırlanmasına yönelik çalışmalar incelendiğinde farklı hazırlama yöntemleri belirlenmiştir. Kullanılan hazırlama yöntemlerinin seçiminde, etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinin ve polimer tipinin önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda hidrofobik etkin maddeler için tercih edilen, yüksek enkapsülasyon etkinliği ve üretim verimi sağlayan, ve bunlara ek olarak sağladıkları uygulama kolaylığı nedeniyle kitozan bazlı mikropartiküller için iyonik jelasyon yöntemi, PLGA bazlı mikropartiküller için ise emülsifikasyon-solvent buharlaştırma tekniği kullanılmıştır. Kitozan bazlı mikropartiküllerde TPP çapraz bağlayıcı olarak, $Mg(OH)_2$ ise baz kaynağı olarak kullanılmıştır. Öncelikle formülasyonlar üzerine pH'nın etkisi incelenmiş ve en uygun pH koşulunun kitozan çözeltisinde 3,37 ve TPP çözeltisinde 10,78 olduğu belirlenmiştir. Daha sonra karıştırma hızı ve kitozan konsantrasyonu değiştirilmiş ve en uygun karıştırma hızı 800 rpm ve kitozan miktarı % 0,2 olarak seçilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda TPP kullanılarak hazırlanan mikropartikül formülasyonlarında ideal TPP konsantrasyonu ise % 0,75 olarak belirlenmiştir.

PLGA bazlı mikropartikül formülasyonları hazırlanırken yapılan literatür araştırmaları sonucunda belirlenen karıştırma hızı, ön formülasyon çalışmaları ile test edilmiş ve her üretimde belirli bir aralıkta partikül büyüklüğüne sahip formülasyonların elde edilebilmesi için üretimde aynı karıştırma hızının (800 rpm) kullanılmasına karar verilmiştir. Çalışmamızda stabilizan madde olarak PVA ve CTAB kullanılmış, PLGA'nın konsantrasyonu ve tipinin mikropartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda PLGA'nın % 3'lük konsantrasyonu ve 50:50 bileşimli tipinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Hazırlanan mikropartiküllerin eklem içerisine birlikte verilmeleri için çeşitli termojel formülasyonları geliştirilmiştir. Bu amaçla İA enjeksiyona olanak sağlayacak şekilde oda sıcaklığında çözelti halinde olan ve 37 °C’ de ise jelleşerek mikropartiküllerin eklem içerisinde lokalizasyonunu sağlamaya yardımcı olan termojel formülasyonları incelenmiş ve nötr kitozan çözeltilerinin bu özelliklere sahip olduğu görülmüştür. İlk olarak termojel formülasyonlarında kullanılacak kitozanın molekül ağırlığının belirlenmesi için viskozite ve enjekte edilebilirlik incelemeleri yapılmış, en uygun olanın orta molekül ağırlıklı kitozan olduğu belirlenmiştir. Daha sonra ise asidik pH değerine sahip kitozan çözeltisinin nötrleştirilmesi için farklı pH ve konsantrasyon değerlerindeki boraks ve ASP çözeltileri kullanılarak kitozan çözeltisinin nötrleştirme işlemi yapılmıştır. Hazırlanan termojel formülasyonlarının karakterizasyon testleri yapılmış ve kitozan çözeltisinin nötrleştirilmesi için kullanılması gereken en uygun bazik madde çözeltisinin % 45 (a/h) konsantrasyonundaki ASP olduğu belirlenmiştir.

En son basamakta eklem içerisine verilmek üzere tasarlanan mikropartikül/termojel sistemlerinin seçilerek homojenize edilmesi yer almaktadır. Bu amaçla arzu edilen fizikokimyasal ve salım özelliklerini gösteren mikropartiküllerin CH3, P6, P8 ve P11 kodlu formülasyonlar olduğu, termojel formülasyonlarından ise T4 formülasyonunun jelleşme süresi ve enjekte edilebilirlik açısından ideal formülasyon olduğu belirlenmiştir. T4 kodlu termojel ile CH3, P6, P8 ve P11 mikropartikül formülasyonları oda sıcaklığında homojenize edilerek mikropartikül/termojel formülasyonları hazırlanmış ve çeşitli in vitro analizleri yapılarak değerlendirilmiştir.

4.3. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.3.1. Mikropartiküllerin Verimlerine ve Enkapsülasyon Etkinliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Kitozan ve PLGA mikrokürelerine ait verim ve enkapsülasyon etkinliğine ait bulguların değerlendirmesine yönelik sonuçlar aşağıda yer almaktadır.

Kitozan Mikropartiküller

Çalışmamızda kitozan ve PLGA bazlı mikropartiküllerin üretim verimlerinin değerlendirilmesi için mikropartiküllerin fizikokimyasal özelliklerine etkili olan çeşitli parametreler değiştirilerek formülasyonlar hazırlanmıştır. İlk olarak kitozan mikropartiküllerinin üretim verimine etkili olabilecek karıştırma hızı, kitozan ve TPP çözeltisinin pH değerleri ile TPP ve kitozan konsantrasyonları gibi parametreler incelenmiş ve hazırlanan kitozan mikropartiküllerinin üretim verimleri değerlendirildiğinde Çizelge 3.11’ de görüldüğü gibi etkili parametrelerin pH, TPP ve kitozan konsantrasyonu olduğu görülmüştür. Kitozan ve TPP çözelti pH değerlerinin verim üzerine etkisi incelendiğinde, asıl etkenin pH değişimine bağlı olarak kitozan ve TPP molekülleri arasında gerçekleşen elektriksel çekim kuvvetlerinde meydana gelen değişime bağlı olarak mikropartiküllerin fizikokimyasal özelliklerindeki farklılaşmanın olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12’deki değerler karşılaştırıldığında mikropartiküllerin üretim verim değerleri ve enkapsülasyon etkinlikleri arasında pozitif bir korelasyonun olduğu görülmüştür. Kitozan bazlı mikropartiküllerin üretim verimleri üzerine etkili olan bir başka parametre ise TPP konsantrasyonu olmuştur. Yaptığımız çalışmada, iyonik jelasyon yöntemi ile mikropartikül üretimi için belirli bir aralıkta TPP konsantrasyonunun kullanılması gerektiği belirlenmiştir. Bu konu ile ilgili yapılan literatür incelemelerinde düşük konsantrasyondaki TPP çözeltisi kullanımı sonucunda, TPP miktarının kitozan molekülleri ile elektriksel etkileşmesi için yetersiz olduğu söylenmiş ve bunun aksine yüksek konsantrasyonlarda TPP’nin kullanımı sonucunda partikül agregatlarının oluştuğu belirtilmiştir (Hou ve ark., 2015; Jain ve ark., 2016; Liu ve Gao, 2009). Kitozan mikropartiküllerin üretim verimleri üzerine kitozan miktarının da etkili olduğu görülmüş ve kitozan miktarındaki artışın üretim verimi azalttığı belirlenmiştir. Kitozan miktarındaki artışın üretim verimini azaltmasındaki etkenin, üretimde kullanılan TPP miktarına oranla kitozan miktarının fazla gelmesi ve buna bağlı olarak TPP moleküllerinin kitozan moleküllerinin tamamı ile elektriksel etkileşime geçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kitozan mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliklerini; karıştırma hızı, üretimde kullanılan çözelti pH değerleri, TPP konsantrasyonu ve kitozan miktarı gibi parametrelerin etkilediği yapılan literatür incelemesi sonucunda görülmüştür (Elwerfalli ve ark., 2015; Gan ve Wang, 2007; Hou ve ark., 2015; Katiyar ve ark., 2014; Konecsni ve ark., 2012; Wu ve ark., 2005). Çalışmamızda iyonik jelasyon yöntemi ile üretilen kitozan mikropartikül formülasyonlarının enkapsülasyon

etkinlikleri üzerine karıştırma hızı, kitozan ve TPP çözelti pH değerleri ile kitozan ve TPP çözelti konsantrasyon parametrelerinin etkileri incelenmiş ve bu parametreler değiştirilerek hazırlanan mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri % 42,14 ve % 78,54 arasında elde edilmiştir. Ancak geliştirdiğimiz çeşitli kitozan mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri üzerinde istatistiksel karşılaştırma yapıldığında enkapsülasyon etkinliği üzerinde etkili olan parametreler Çizelge 3.12’ de görüldüğü gibi kitozan ve TPP çözeltilerinin pH değeri ile kitozan miktarı olmuştur. İlk olarak hazırlamış olduğumuz mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri üzerine pH’ nın etkisine bakıldığında kitozan çözelti pH değerinin enkapsülasyon derecesini etkilediği görülmüştür. Kitozan çözelti pH’sı 2,49’dan 3,37’ ye çıktığında enkapsülasyon etkinliği artmış ancak pH’nın artmaya devam etmesiyle enkapsülasyon etkinliği azalmaya başlamıştır. Tenoksikamın enkapsülasyonunda pH’nın etkili olmasının esas nedeninin tenoksikamın göstermiş olduğu çözünürlük özelliklerinin olduğu düşünülmektedir. Çözelti asitliğinin artmasıyla tenoksikamın çözünürlüğünde bir artış saptanmış (Moya-Hernández ve ark., 2003) ve etkin maddenin polimer zincirleri arasında homojen dağılımı sağlanarak ve dolayısıyla enkapsülasyon etkinliği artmıştır. Özellikle pH 3 değerinden sonra tenoksikamın çözünürlüğünün azalmasına bağlı olarak (Moya-Hernández ve ark., 2003) enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı düşünülmektedir. Ancak kitozan çözelti pH değeri 3’ den 2’ ye indirildiğinde enkapsülasyon etkinliğinin azalmasında ise Bölüm 4.3.2.’ de bahsedildiği gibi kitozan zincirlerin elastik yapıda olmaması ve dolayısıyla etkin maddeyi polimerik zincirleri arasına alamamasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Kitozan mikropartiküllerin etkin madde enkapsülasyonu üzerinde etkili olan bir diğer parametre ise kitozan konsantrasyonu olmuştur. Yapılan literatür incelemelerinde mikropartikül formülasyonlarında kitozan miktarının, enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi araştırıldığında farklı yaklaşımların olduğu görülmüştür. Kitozan miktarının artmasıyla enkapsülasyon etkinliğinde artma (Elwerfalli ve ark., 2015) ya da azalma (Gan ve Wang, 2007; Hassani ve ark., 2015; Wu ve ark., 2005) görülebilmektedir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise artan kitozan miktarı ile enkapsülasyon etkinliği arasında negatif bir korelasyon söz konusudur. Çizelge 3.12’ de görüldüğü gibi % 0,2 konsantrasyonunda kitozan kullanıldığında % 0,3 ve % 0,4’e göre daha yüksek oranda etkin maddenin enkapsüle edilmiştir. Gözlenen bu negatif korelasyonun çeşitli sebepleri olduğu düşünülmektedir. Örneğin S. Hassani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada katyonik özellikli etkin maddenin, anyonik özellikteki TPP ile elektrostatik çekim kuvvetleri aracılığıyla aralarında bir etkileşim olabileceği ve bu nedenle katyonik kitozan ile bir yarışmaya girebileceği öne

sürülmüştür (2015). Bu hipoteze ek olarak yapılan başka çalışmalarda kitozan miktarındaki artış ile enkapsülasyon etkinliğindeki azalmanın artan viskozite nedeniyle jelleşmenin güçleşmesinden kaynaklı olabileceği söylenmektedir (Gan ve Wang, 2007; Wu ve ark., 2005). Bu her iki yaklaşımın tenoksikamın asidik çözeltilerdeki katyonik yapısı (Moya-Hernández ve ark., 2003) göz önüne alındığında mümkün olduğu söylenebilir. Bunlara ek olarak elde ettiğimiz bulgulara kitozan miktarının % 0,3'den % 0,4'e çıktığında ise enkapsülasyon etkinliğinde % 10'a yakın bir artış görülmüştür. Bu artışın nedeninin yüksek kitozan konsantrasyonlarında tenoksikam ile kitozan arasında oluşan hidrojen bağlarının baskınlaşması ile enkapsülasyon etkinliğinde artmanın olabileceği düşünülmektedir (Konecsni ve ark., 2012).

PLGA Mikropartiküller

PLGA bazlı mikropartiküllerin hazırlanması sırasında mikropartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin üzerine karıştırma hızı, PLGA tipi ve konsantrasyonu ile sürfaktan madde tipi ve konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. PLGA mikropartiküllerinin üretim verimleri incelendiğinde karıştırma hızı ve PLGA miktarının verim üzerinde etkisinin az olduğu görülmektedir (Çizelge 3.11), bu nedenle tüm üretimlerde 800 rpm karıştırma hızı tercih edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği düşük olan formülasyonlarda verimin de düşük olduğu görülmüştür.

Emülsifikasyon solvent buharlaştırma tekniği ile üretilen PLGA mikropartiküllerinin enkapsülasyon etkinlikleri üzerinde birçok parametre etkilidir. Çizelge 3.12' e bakıldığında hazırlanan formülasyonlarda PLGA miktarı hariç diğer parametrelerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkili olduğu görülmektedir. P2, P3 ve P4 formülasyonlarına bakıldığında artan PVA miktarının tenoksikamın enkapsülasyonunda azalmaya neden olduğu görülmektedir. Aynı şekilde artan CTAB konsantrasyonu ile enkapsülasyon etkinliğinde azalma meydana gelmiştir. Benzer çalışmalar incelendiğinde bizim sonuçlarımıza benzer sonuçların görüldüğü çalışmalara rastlanılmıştır. Örneğin Song ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada artan PVA konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliğini azalttığını göstermişlerdir (2008). Girotra ve arkadaşları da yapmış oldukları çalışmada PVA konsantrasyonundaki artışın partiküllerin enkapsülasyon etkinliğinde azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir (2016). Artan PVA miktarının enkapsülasyon etkinliğini azaltmasında rol oynayan faktörler, sürfaktan madde miktarındaki artış ile hidrofobik bir etkin madde olan tenoksikamın sulu fazda çözünürlüğünün artması ile yağ

fazından sulu faza difüzyonunun artması veya artan PVA konsantrasyonunun emülsiyon damlacık büyüklüğünde azalmaya neden olarak etkin maddenin sulu faza difüzyonunu kolaylaştırmış olmasıdır.

Enkapsülasyon etkinliği üzerinde PLGA miktarının etkisi olmamasına rağmen PLGA türünün etkili olduğu görülmüştür. Aynı CTAB konsantrasyonlarına sahip farklı polimer özelliğine sahip formülasyonlar karşılaştırıldığında PLGA (75:25)'in kullanıldığı formülasyonlarda PLGA (50:50)'nin kullanıldığı formülasyonlara göre etkin madde enkapsülasyonunda azalmanın olduğu görülmüştür. Goodfriend ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada benzer sonuçlar elde etmişlerdir ve bu azalmanın nedeninin PLGA (75:25)'in PLGA (50:50)'ye göre daha az oranda glikolik asit içermesi olduğunu belirtmişlerdir. Çünkü glikolik asit zincirlerinin laktik asit zincirlerine oranla daha hareketli olduklarını ve etkin madde enkapsülasyonuna daha elverişli olduğunu söylemişlerdir (2016). İddia edilen bu hipotezin kendi çalışmamız için de geçerli olabileceği düşünülmektedir.

4.3.2. Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Kitozan ve PLGA mikrokürelerine ait partikül büyüklüğü değerlendirmesine yönelik sonuçlar aşağıda yer almaktadır.

Kitozan Mikropartiküller

İyonik jelasyon yöntemiyle üretilen mikropartiküllerin partikül özellikleri birçok parametreden etkilenmektedir. İlk parametre olarak kitozan ve TPP çözeltilerinin pH değerlerinin etkisi incelenmiştir. Katyonik özellikli kitozanın asidik ortamda çözünmesi ve çözünen kitozanın yüzey yükünün çözelti pH'ına göre değişmesi iyonik jelasyon yöntemiyle kitozan partikül oluşumu için önemli bir etkin olduğu düşünülmektedir. Kaloti ve Bohidar, yapmış oldukları çalışmada düşük pH değerlerinde kitozanın amin gruplarının tamamen proton almış halde olduğunu ve pH'ının nötrale yaklaşmasıyla amin gruplarındaki bu proton doygunluğunun azaldığını tespit etmiştir. Ayrıca proton doygunluğu azalan kitozan zincirlerinin tamamen protonize olan kitozan zincirlerine oranla zincir içi itme kuvvetlerinin azalmasıyla daha fazla elastik olduğu görülmüş ve bu zincir elastikiyeti nedeniyle

ortama eklenen TPP ile zincir içi elektrostatik etkileşime geçebileceği saptanmıştır (2010). Sipoli ve arkadaşları da aynı düşüncüyü paylaşmış ancak pH değerindeki belirli bir artıştan sonra elastik kitozan zincirlerinin kendilerini kapatarak çemberimsi bir hal adlıklarını belirtmişlerdir. Oluşan bu çemberimsi zincir yapısının TPP içe zincir içi bağlanmayı engelleyip zincirler arası etkileşmenin artmasına neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca pH artışıyla ortamda artan hidroksil iyonunun kitozanın pozitif yüklü amin gruplarıyla etkileşerek kitozanın hızlı presipitasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (2015). Yapmış olduğumuz çalışmada kitozan ve TPP çözelti pH' larının etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Kitozan çözelti pH' sının 2'den 3'e çıkarıldığında partikül boyutunda bir azalma görülmüştür (Çizelge 3.13). Daha sonraki basamakta pH'nın 3'den 5'e doğru artışında partikül büyüklüğünde de artmaya sebep olmuştur. Partikül boyutunda gözlenen bu değişikliklerin nedeni irdelendiğinde düşük pH değerinde (pH:2) kitozan zincirlerinin elastik olmamasından kaynaklı bir şekilde farklı zincirler arasında etkileşmenin olduğu düşünülmektedir. pH değeri 3'e çıktığında elastik zincir oluşumuyla zincir içi TPP bağlanmalarının artması ile partikül boyutunda azalmanın olduğu ve pH'nın daha da artmasıyla zincir kapanmasının gerçekleşerek çemberimsi zincirler arası TPP etkileşmesi ile partikül boyutunda artış olduğu düşünülmektedir. % 0,75 (a/h) TPP çözeltisinin pH'sı 8,85 iken $Mg(OH)_2$ ilavesiyle pH değerinin 10,78'e çıkışı sağlanmış ve bu değişimin etkisi incelenmiştir. Partikül boyutu üzerindeki etkisine bakıldığında yüksek pH değerindeki TPP çözeltisinin partikül boyutunda bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin, yüksek pH' ya sahip çözeltinin kitozanın presipitasyonunu hızlandırması ve ortamdaki TPP iyonu ile başka kitozan zincirlerinin partikül bünyesine bağlanmasını azaltarak partikül büyümesini engellemesi şeklinde açıklanabilir.

Karıştırma hızı partikül boyutunu etkileyen bir başka parametredir. A. Jain ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada karıştırma hızı arttıkça partikül boyutunda küçülme gözlemlemiştir (2016). Yaptığımız çalışmada bu sonucu destekler nitelikte; düşük karıştırma hızında partiküller daha büyük, karıştırma hızının artırılmasıyla daha küçük boyutta partiküller elde edilmiştir. Çizelge 3.13' e bakıldığında 800 rpm karıştırma hızında üretilen CH8 formülasyonunun partikül boyutunun 400 ve 600 rpm hızlarında üretilen mikropartiküllere göre daha küçük bulunmuştur.

Partikül boyutu üzerinde etkili başka bir faktör ise TPP konsantrasyonudur. Liu ve Gao yapmış oldukları çalışmada iyonik jelasyon yöntemi ile kitozan partiküllerin oluşmasında, partikül büyüklüğünde ve oluşan partiküllerin aglomere olmasında TPP konsantrasyonunun kritik parametre olduğunu bulmuşlardır. Partiküllerin oluşması için optimal bir TPP konsantrasyonunun olduğu ve bu konsantrasyon değerinin altında partiküller oluşmazken yüksek değerlerde ise partikül agregatları olduğu görülmüştür. Ayrıca optimal TPP konsantrasyonu aralığında TPP konsantrasyonu arttıkça partikül boyutunda küçülme görülmüştür. Partikül boyutunda görülen bu küçülmenin nedeninin ise; TPP konsantrasyonu artışıyla kitozan ile TPP arasında gerçekleşen artan elektrostatik etkileşimler ile daha kompakt bir yapı elde edilmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (2009). TPP konsantrasyonunun partikül büyüklüğü üzerine etkisinin incelendiği başka çalışmalarda da benzer bir şekilde partikül oluşumunun gözlendiği TPP konsantrasyonu aralığında partikül büyüklüğü çan eğrisi şeklinde olabildiği görülmüştür. Düşük TPP konsantrasyonunda partiküller daha büyük iken, TPP konsantrasyonu arttıkça partikül boyutunda küçülme gözlenmiştir. Ancak çok yüksek TPP konsantrasyonlarında agregatlar oluşarak partikül büyüklüğünde artma görülmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda TPP'nin kullanıldığı durumlarda anyonik yapıya sahip TPP ile katyonik yapıli kitozanın elektriksel etkileşmesi sonucunda yüzey yükünde bir azalmanın olduğu ve bundan dolayı partikül boyutunda artış olduğu düşünülmektedir (Hou ve ark., 2015; Jain ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda ise kitozan konsantrasyonu % 0,2' de sabit tutularak TPP konsantrasyonu % 1,00-0,25 aralığında değiştirilmiştir. % 0,25 TPP konsantrasyonunda TPP ve kitozan arasındaki elektriksel etkileşimlerin yeterli olmayarak partiküllerin oluşmadığı düşünülmektedir. TPP konsantrasyonu % 0,50-0,75-1,00 şeklinde artan bir konsantrasyonda uygulandığında yapılan istatistiksel inceleme sonrasında % 0,50 ile % 0,75 konsantrasyonlarında anlamlı bir fark ($p>0,05$) gözlenmese de partikül boyutunda azalma eğilimi gözlenmiştir. Ancak % 1,00 TPP ile hazırlanan formülasyonun % 0,75 TPP ile hazırlanan formülasyona göre partikül boyutunun daha düşük olmasına rağmen SPAN değerindeki artış partiküllerin agregatlar oluşturduğunu düşündürmektedir.

Partikül büyüklüğü üzerinde kitozanın etkisi incelendiğinde bu konuda yapılan birçok çalışmada TPP konsantrasyonu yeterli olduğu sürece kitozan miktarı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı gözlemlenmiştir (Bagre ve ark., 2013; Gan ve ark., 2005; Hou ve ark., 2015; Jain ve ark., 2016; Liu ve Gao, 2009; Zaki ve ark., 2015). Yaptığımız çalışmada % 0,75 TPP oranı sabit tutulmuş ve kitozan miktarı % 0,2 ile 0,4 arasında değiştirilerek partikül büyüklükleri incelenmiştir. Beklenildiği gibi

kitozan miktarı arttıkça partikül büyüklüğü artmıştır. % 0,2 TPP oranında ortalama partikül büyüklüğü 59,57 μm 'yi bulunmuştur. Ancak kitozan oranı % 0,3'e çıkarıldığında ortalama partikül boyutu 85,57 μm ' ye çıkmıştır. Kitozan oranı % 0,4'e çıktığında ise partikül boyutu 100 μm ' yi aşmıştır.

Kitozan mikropartiküllerinin partikül büyüklük dağılımları SPAN değerleri aracılığı ile değerlendirilmiştir. SPAN değerinin yüksek olması partikül büyüklük dağılımının daha geniş olduğunu ifade etmektedir. Kitozan mikropartikül formülasyonları incelendiğinde % 0,5 TPP konsantrasyonunun kullanıldığı CH9 ve % 0,3 kitozan konsantrasyonunun kullanıldığı CH11 formülasyonlarının SPAN değerlerinin 5' in üzerine çıktığı diğer formülasyonlarda ise bu değerin 2-3,5 arasında seyrettiği görülmektedir.

PLGA Mikropartikülleri

Emülsifikasyon solvent buharlaştırma tekniği ile üretilen PLGA mikrokürelerin partikül büyüklükleri sürfaktan cinsi ve miktarı, polimer bileşimi ve miktarı, polimer ve sürfaktanın molekül ağırlığı, etkin madde miktarı ve karıştırma hızı gibi birçok parametreden etkilenmektedir (Doolaanea ve ark., 2015; Goodfriend ve ark., 2016; Krishnamachari ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2014; Nahata ve Saini, 2008; Şengel-Türk ve ark., 2012; Zhang ve Gao, 2007). Yapmış olduğumuz çalışmada Çizelge 2.2' de gösterildiği gibi karıştırma hızı, PLGA miktarı ve türü, sürfaktan madde miktarı ve türü olmak üzere çeşitli parametrelerin partikül büyüklüğüne etkisi incelenmiştir. İlk parametre olarak önformülasyon çalışmaları kapsamında karıştırma hızı incelenmiş ve karıştırma hızının 400 rpm' den 800 rpm' e çıkmasıyla partikül büyüklüğünde ciddi bir azalmanın olduğu görülmüştür. Bu düşüşün sebebi ise yüksek hızda karıştırma işlemi uygulamanın yağ fazını su fazı içerisinde daha homojen bir şekilde dağıtarak daha küçük damlacıkların oluşması ve dolayısıyla elde edilen partiküllerin büyüklüğünde azalmanın meydana gelmesi şeklinde ifade edilebilir. Zhang ve arkadaşları karıştırma hızını 400 rpm' den 800 rpm' e çıkararak partikül büyüklüğünde 71,7 μm 'den 54,3 μm 'ye düşüşü sağlamıştır (2007). Benzer bir şekilde Kumar ve arkadaşları da yapmış oldukları çalışmada karıştırma hızını 2000 rpm' den 3500 rpm' e çıkardıklarında partikül büyüklüğünün 5,1 μm 'den 4,3 μm 'e düştüğünü görmüşlerdir (2014). Yaptığımız çalışmamızda partikül büyüklüğünü etkileyen bir diğer faktör de polimer miktarı olmuştur. P4, P5 ve P6 formülasyonlarında sırasıyla %1, %2 ve %3 PLGA kullanılmış ve ortalama partikül boyutları sırasıyla 9,27 μm , 11,43 μm ve 14,73 μm olmak üzere doğrusal bir şekilde artış göstermiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara benzer sonuçlar başka çalışmalarda da görülmüştür. Örneğin Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada karıştırma hızının yanı sıra polimer konsantrasyonunun partikül büyüklüğüne etkisini incelemiş ve konsantrasyon artışı ile partikül büyüklüğünde artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu artışın sebebinin ise üretim esnasında henüz tam olarak katılaşmamış polimer damlacıkları arasında füzyon olabileceği ya da polimer konsantrasyonunun artmasıyla organik faz viskozitesinde artışın olması ve bunun sonucunda emülsiyon damlacıklarının sahip oldukları optimal kayma hızlarını kaybederek damlaların birleşmesi olabileceğini söylemişlerdir (2007). Yukarıda bahsedildiği gibi partikül üzerinde etkili olan diğer bir parametre sürfaktanın cinsi ve miktarıdır. Yapmış olduğumuz çalışmada PVA ve CTAB olmak üzere iki farklı sürfaktan farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. İlk olarak PVA' yı ele aldığımızda konsantrasyonu % 1'den % 5'e çıkarılmış ve ortalama partikül büyüklüğünde 17,83 μm ' den 9,27 μm ' ye düşüş elde edilmiştir. PVA'nın sürfaktan olarak kullanıldığı diğer çalışmalarda da elde ettiğimiz sonucu destekler sonuçlar bulunmuştur. Krishnamachari ve arkadaşları PVA konsantrasyonunu % 1'den % 5'e çıkartmış ve ortalama partikül büyüklüğünde 34,03 μm ' den 14,61 μm 'ye düşüş olduğunu görmüşlerdir. Sürfaktan madde artışı ile partikül büyüklüğünde gözlenen bu azalmanın nedeninin ise sürfaktan konsantrasyonu artışıyla emülsiyon damlacık büyüklüğünde azalmanın olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda sürfaktan kullanıldığında sürfaktan maddenin organik fazın damlacık yüzeylerini örtme konusunda yeterli olamayacağı ve damlacıklar arasında birleşmenin gerçekleşmesi sonucunda partikül büyüklüğünde artış olabileceğini söylemişlerdir. (2007). Krishnamachari haricinde bu sonucu destekler çalışmalar da mevcuttur (Kumar ve ark., 2014; Nahata ve Saini, 2008). Çalışmamızda bir diğer sürfaktan olarak, PVA'ya oranla daha küçük partikül büyüklüğü eldesine izin veren (Ismail ve ark., 2012) ve partiküllere pozitif yüzey yükü sağlayan (Le Broc-Ryckewaert ve ark., 2013) CTAB % 0,5, % 1,0 ve % 1,5 konsantrasyonlarında kullanılmıştır. % 0,5' den % 1,0' e konsantrasyon çıkarıldığı zaman partikül büyüklüğü 31,43 μm ' den 12,37 μm ' ye düşmüştür. Ancak konsantrasyonun % 1,5' e çıkmasıyla partikül boyutunda artma olmuş ve 32,70 μm olarak elde edilmiştir. Pradhan ve arkadaşları sürfaktan olarak CTAB kullandıkları PLGA nanopartikül formülasyonlarında sürfaktan konsantrasyonunu % 0,25-2 aralığında değiştirerek partikül boyutu üzerine etkilerini incelemişler ve bizim çalışmamızı destekler nitelikte partikül büyüklüğü değişiminin çan eğrisi şeklinde olduğunu görmüşlerdir. CTAB konsantrasyonunun % 0,25' den % 0,5' e çıkmasıyla partikül büyüklüğünde azalmanın olduğu ve konsantrasyonun % 0,5' den % 2'ye kadar artırıldığında partikül büyüklüğünde artışın olduğunu tespit etmişlerdir (2015).

CTAB konsantrasyonundaki artış ile partikül büyüklüğünde de artışın gerçekleşmesinin nedenlerinin su fazı viskozitesinin artması, CTAB'ın kendi misel yapısı oluşturmaya ve doygunluk limitini aşması gibi etkenlerin olabileceği düşünülmektedir. Düşük CTAB konsantrasyonunda partikül boyutunun fazla olması ise çoğu sürfaktanda olduğu gibi CTAB konsantrasyonunun emülsiyon damlacık yüzeyini örtmeye yeterli gelmeyerek damlacık büyümesine yol açması şeklinde düşünülmektedir. CTAB konsantrasyonunun partikül üzerindeki bu etkileri ve eklem içine uygulanmak için arzu edilen partikül büyüklüğü değeri göz önüne alındığında çalışmamız için optimal CTAB konsantrasyonunun % 1 olduğu görülmektedir. Son parametre olarak PLGA tipinin partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelendiğinde PLGA(75:25) ile üretilen mikropartiküllerin partikül büyüklüklerinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun esas nedeninin polimerin molekül ağırlığının daha fazla olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Hazırlanan PLGA bazlı mikropartiküllerin partikül büyüklük dağılımı hakkında bilgi veren SPAN değerlerine bakıldığında, partikül büyüklük dağılımını etkileyen parametrenin sürfaktan tipi olduğu anlaşılmıştır. Sürfaktan olarak PVA'nın kullanıldığı formülasyonlarda SPAN değerleri 1,11 ile 2,06 arasında değişirken CTAB'ın kullanıldığı formülasyonlarda 2,45 ile 4,85 arasında değişmekte olduğu görülmüş ve istatistiki açıdan SPAN değerlerindeki bu değişimin anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bu konuda literatür incelemesi yapıldığında Jain ve Kumar yapmış oldukları çalışmada bizim elde ettiğimiz sonuca benzer bir şekilde, sürfaktan olarak CTAB'ın kullanıldığı durumlarda PVA'ya göre daha geniş partikül büyüklük dağılımı elde etmişlerdir (2010).

4.3.3. Mikropartiküllerin Yüzey Yüklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Zeta potansiyeli kolloidal sistemlerde disperse olan fazın sürekli faz içerisindeki davranışını belirleyen önemli bir faktördür. Katı partikül ile sıvı arasında oluşan elektriksel çift tabakanın bir ölçütü olan zeta potansiyeli, partiküllerin su üzerinde yüzme ya da aglomere olması gibi davranışları üzerinde etkilidir. Bu nedenle de zeta potansiyeli partiküler sistemlerin stabilitesi için önemli bir parametredir (Salopek ve ark., 1992). Bu nedenlerle hazırlanan mikropartikül formülasyonlarının yüzey yükü kaynaklı davranışlarını incelemek amacıyla zeta potansiyelleri ölçülmüş ve değerlendirilmiştir.

Kitozan Mikropartiküller

Kitozan mikropartiküllerinin fizikokimyasal özelliklerinin üzerine karıştırma hızı kitozan ve TPP çözelti pH değerleri, TPP ve kitozan konsantrasyonu gibi parametrelerin etkisi incelenmiş ve bu parametrelerden partikül yüzey yükleri üzerinde pH, TPP ve kitozan konsantrasyonlarının etkili olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). İlk olarak pH'nın zeta potansiyeli üzerine etkisi incelendiğinde hem kitozan çözeltisi hem de TPP çözeltisinin zeta potansiyeli üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Kitozan çözeltisi pH değerlerine bakıldığı zaman pH değerindeki artışın zeta potansiyelinde de artışa neden olduğu görülmüştür. Liu ve Gao yapmış oldukları çalışmada kitozan çözelti pH değerinin artmasıyla zeta potansiyelinin arttığını görmüş ve bunun düşük pH değerlerinde kitozanın negatif yüklü iyonları adsorbe etmesinden kaynaklı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Partiküllerin yüzey özellikleri üzerine TPP çözeltisinin pH'ının etkisine bakıldığında düşük pH değerindeki TPP çözeltisi ile üretilen mikropartikülün zeta potansiyeli değerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Yüksek pH değerli TPP çözeltisi mikropartiküllerin hazırlama yönteminde anlatıldığı gibi TPP çözeltisine $Mg(OH)_2$ süspansiyonu ilavesiyle sağlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti ile kitozan çözeltisinin karıştırılmasıyla total karışımdaki OH^- iyon miktarının artarak katyonik kitozan ile etkileşmesi sonucu kitozanın pozitif yük miktarındaki azalmadan kaynaklı olarak zeta potansiyelinde azalmanın olabileceği düşünülmektedir. Partikül yüzey yükü üzerine etkili diğer bir parametre olan TPP konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde TPP konsantrasyonu arttıkça zeta potansiyelinde azalmanın olduğu görülmüştür. TPP konsantrasyonu % 1, % 0,75 ve % 0,5 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda incelenmiş ve sırasıyla 11,68 mV, 9,56 mV ve 9,16 mV şeklinde ölçülmüştür. TPP konsantrasyonu arttıkça zeta potansiyelinde azalmanın meydana gelmesi, anyonik özellikteki TPP konsantrasyonunun artmasıyla katyonik kitozan ile elektriksel daha fazla etkileşmesi sonucunda total katyonik yük miktarını azaltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İyonik jelasyon yöntemi ile üretilen kitozan partiküller üzerinde başka araştırmacıların bulguları da TPP konsantrasyonunun artmasıyla zeta potansiyelinde azalmanın görülmesi şeklindedir (Liu ve Gao, 2009; Sipoli ve ark., 2015). Mikropartiküllerin yüzey yükü üzerine kitozan konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde kitozan miktarındaki artışın zeta potansiyelde artmaya neden olduğu görülmüştür. Çalışmamızda % 0,2, % 0,3 ve % 0,4 konsantrasyonlarında kitozanla çalışılmış ve sırasıyla 9,56 mV, 10,30 mV ve 15 mV olacak şekilde zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Kitozan konsantrasyonundaki artışın zeta potansiyelinde artışa neden olmasının sebebi kitozanın taşıdığı katyonik özellikten kaynaklanmaktadır.

Literatür incelemesi yapıldığında da kitozan konsantrasyonu artışının zeta potansiyelinde de artışa neden olduğu görülmektedir (Antoniou ve ark., 2015; Luo ve ark., 2010; Sipoli ve ark., 2015).

PLGA Mikropartiküller

Hazırladığımız PLGA mikropartiküllerinin zeta potansiyeli değerleri Çizelge 3.14'de verilmiştir. Formülasyonların zeta potansiyelleri için istatistiksel değerlendirme yapıldığı zaman anlamlı bir değişime yol açan faktörlerin karıştırma hızı, sürfaktan cinsi ve konsantrasyonunun olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Öncelikle PVA' nın mikropartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi incelenmiş ve pek çok çalışmada olduğu gibi PVA, partiküllere negatif yüzey yükü kazandırmıştır (Türk, 2014; Kumar, 2014; Vandervoort, 2004). Ayrıca PVA miktarı zeta potansiyeli değerleri üzerinde etkili olmuş ve % 1, % 3 ve % 5 PVA içeren formülasyonların zeta potansiyelleri sırasıyla -20,26, -17,80 ve -16,02 şeklinde azalmıştır. Bu formülasyonların zeta potansiyellerindeki değişime bakıldığında PVA konsantrasyonunun artmasıyla zeta potansiyelinde bir azalmanın olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuca benzer şekilde Kumar ve arkadaşları çalışmalarında PVA miktarını % 0,5 - 2 aralığında kullanarak mikropartikülleri hazırlamışlar ve PVA miktarının artmasıyla zeta potansiyelinde bir azalma eğiliminin olduğunu görmüşlerdir (2014).

Osteoartrit tedavisi için eklem içine enjekte edilen partiküler sistemlerin eklem içerisinde kalış sürelerini artırmaya yönelik stratejilerden biri Bölüm 1.5.2.2.' de anlatıldığı gibi partiküllere pozitif yüzey yükü kazandırmaktır. Bu amaçla partiküllere negatif yüzey yükü kazandıran PVA'nın yerine sürfaktan olarak CTAB' ın kullanıldığı mikropartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Partiküllerin yüzey yüklerinin ölçümü yapıldığında pozitif zeta potansiyeli elde edildiği görülmüştür. Sürfaktan olarak CTAB' ın kullanıldığı PLGA partiküllerinin çalışıldığı literatürler incelendiğinde sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür (Chu, 2011; Singh, 2003; Basarkar, 2007; Pradhan, 2015; Singh, 2000). CTAB partiküllere pozitif yüzey yükü kazandırmanın yanı sıra konsantrasyonunun artışı ile zeta potansiyelinde artış göstermiştir. CTAB konsantrasyonunu % 0,5' den % 1' e çıkardığımızda zeta potansiyelin 14,16' dan 31,30' a çıktığı görülmüştür. Ancak CTAB konsantrasyonu % 1,5' a çıkarıldığında zeta potansiyelinde önemli bir değişiklik görülmemiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlara benzer şekilde Pradhan ve arkadaşları da farklı CTAB konsantrasyonlarının partiküllerin zeta potansiyeli üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında CTAB

konsantrasyonunu % 0,25' den % 2' ye kademeli olarak artırdıklarında partikül zeta potansiyellerinde de artış elde etmişlerdir (2015).

Hazırlamış olduğumuz PLGA mikropartiküllerinin zeta potansiyel aralığı -13 ile 30 mV arasında değişen ve özellikle sürfaktan olarak CTAB' ın kullanıldığı formülasyonlarda daha yüksek zeta potansiyeli elde edilmiştir. Partiküler sistemlerin zeta potansiyel değerlerinin stabiliteleri üzerine etkili olduğu göz önüne alındığında stabiliteleri açısından bir sorun olmayacağı düşünülmektedir. Partiküllerin stabiliteleri ile ilgili bu düşüncemizi desteklemek için önstabilite çalışmaları da yapılmıştır.

4.4. Termojel Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.4.1. Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin pH Değerlerinin Değerlendirilmesi

Kitozan bazlı termojellerin üretim prosesinde çözeltilerin pH değerleri en önemli parametrelerden biridir. Çünkü kitozanın presipite olmadan nötralleştirilmesi için Bölüm 1.5.4.4.' de bahsedildiği gibi kitozanın pKa değerine yakın zayıf bazik maddelerin kullanılması gerekmektedir. Bazik maddenin pKa değerinin etkisinin incelenmesi için pKa değeri düşük olan ASP (pKa:6,8-7,2) ve pKa değeri büyük olan boraks (pKa:9) çözeltileri kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ASP çözeltilerinin % 30 ve % 45 konsantrasyonlarında yaklaşık pH 8.1 değerinde ölçülmüştür. Ancak konsantrasyon % 60'a çıkarıldığında çözeltinin pH değeri 7,05'e düşmüştür. pH değerindeki bu düşüşün maddenin çözünme özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek konsantrasyonlardaki ASP çözeltisi yüksek oranda sodyum ve NH_4^+ içermektedir. Ortamda bulunan sodyumun NH_4^+ ün $\text{NH}_3(\text{gaz})$ 'a dönüşümünü tetikleyerek ortamdan ayrılmasını ve ortam pH'sında düşmeye neden olduğu düşünülmektedir. ASP çözeltilerinin aksine boraks ile hazırlanan çözeltilerde pH değişimi gözlenmemiş ve pH değeri yüksek pKa'sının etkisiyle 9 olarak bulunmuştur. Kitozan çözeltilerine bakıldığında ise; % 0,5 (h/h) asetik asit sulu çözeltisi içerisinde % 1,6 (a/h) konsantrasyonunda hazırlanmış kitozan çözeltilerinin pH değerleri yaklaşık olarak 4,95 olarak bulunmuştur. Daha önceden yapılan çalışmalara bakıldığında % 0,25-1 (a/h) asetik asit sulu çözeltisi içerisinde % 0,25-2 (a/h) konsantrasyonunda hazırlanmış kitozan çözeltilerinin pH değerleri yaklaşık 4-6 arasında bulunmuştur (Arunkumar ve ark., 2016; Kaloti ve Bohidar,

2010; McLaughlin ve ark., 2012; Nair ve ark., 2007; Sipoli ve ark., 2015). Ayrıca kitozan çözeltilerinin pH değerlerine kitozanın moleköl ağırlığının etkisinin olmadığı görölmüştür.

Termojel formölasyonları hazırlanmasında kullanılan ASP ve boraks çözeltilerinin pH değerlerinin termojel üretimi için kritik rol oynadığı ve ASP çözeltilisinin düşük pH değeri nedeniyle herhangi bir presipitasyon olmadan kitozan çözeltilisini nötralleştirdiği görölmüştür. Ancak boraks çözeltilisi kitozan çözeltilisine ilave edilmeye başlandığında ortamda hızlı bir presipitasyon sonucu topaklanmaların olduğu görölmüştür. Bu nedenle çözeltili homojenliği sağlanamamış ve arzu edilen nötr kitozan çözeltilisi elde edilememiştir.

4.4.2. Termojel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltilerin ve Formölasyonların Viskozite Değerlerinin Değerlendirilmesi

Termojel üretiminde kullanılacak kitozan çözeltilerinin ve termojellerin viskoziteleri üretim prosesi, üretilen termojel ile partiküllerin karıştırılmasına elverişli olması ve termojelin enjekte edilebilirliği açısından önemli bir etkidir. Termojel üretiminde kullanılacak kitozan çözeltili viskoziteleri çok yüksek değerde olduğu zaman karıştırma işlemini olumsuz olarak etkilemektedir. Üretilen termojelin viskozluğunun çok fazla olması ise mikropartiküller ile homojen karışmasını ve enjeksiyondan serbestçe çıkmasını engellemektedir. Ayrıca çözeltili viskozitesinin kitozan ile jel yapıcı ajanın optimum etkileşmesini sağlayacak seviyede olması gerekmektedir. Termojel formölasyonların üretim prosesinin yanı sıra kullanımı sırasındaki özelliklerinin bilinmesi için reolojik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Örneğin termojel sisteminin uygulanan kayma gerilimine bağlı olarak viskozitesinde değişiklik olup olmadığı yani tiksotropik özellik taşıyıp taşımadığı belirlenmelidir.

Çizelge 1.2' de gösterildiği gibi sinovyal sıvı viskozitesinin alt sınırı sağlıklı bireyde 300 mPas' dır ve osteoartrit görülen bireylerde bu değeri azalmaktadır. Bu nedenle çalışmamız için osteoartrit tedavisi için eklem içine uygulanacak termojel sisteminin viskozite değerinin 300 mPas' dan daha fazla olması istenmiştir. Bu nedenle termojel formölasyonunda hangi moleköl ağırlığında kitozanın kullanılmasının uygun olacağını belirlemek için viskozite ölçümleri yapılmıştır.

Ölçüm sonucunda düşük molekül ağırlıklı kitozan çözeltisinin ve bu çözelti ile hazırlanan termojelin viskozite değerinin 300 mPas'dan düşük olduğu saptanmış, eklem içi uygulama için kullanımının uygun olmayacağı görülmüştür. Yüksek molekül ağırlıklı kitozan ise aşırı viskoz yapısından dolayı tercih edilmemiş bu nedenlerle termojel formülasyonların orta molekül ağırlıklı kitozan ile geliştirilmesine karar verilmiştir. Orta molekül ağırlıklı kitozan ile geliştirilen formülasyonların viskozite ölçümleri yapıldığında eklenen jel yapıcı ajan çözeltileri nedeniyle viskozitelerinde hafif bir azalmanın olduğu görülmüştür. Yapılan bu ölçümlere ek olarak viskozite ölçümleri farklı dönü hızlarında yapılmış ve değişen hıza bağlı olarak viskozite değerleri arasında fark olup olmadığı incelenmiştir. Çizelge 3.16' de görüldüğü gibi ölçüm yapılan dönü hızında artma oldukça viskozitede azalma meydana gelmiştir. Viskozitede meydana gelen bu değişim termojel formülasyonlarının tiksotropik özellikte olduğunu düşündürmektedir (Lee, 2009). Bilindiği üzere tiksotropi dispers sistemlerde partiküllerin çökmemesini sağladığı için arzu edilen bir özelliktir (Troy ve Beringer, 2006). Hazırlanan termojel/mikropartikül kombinasyon formülasyonlarında da partiküllerin çökmemesi için tiksotropi özelliğinin bir avantaj olduğu düşünülmektedir. Ayrıca tiksotropi özelliği gösteren termojellerin herhangi bir gerilim uygulanmadığı durumlarda viskozitelerinin artması ile içerdikleri mikropartiküllerden etkin madde sızmasını engellemeye yardımcı oldukları düşünülmektedir (Lee, 2009).

4.4.3. Termojel Formülasyonlarının Jelleşme Sürelerinin ve Enjekte Edilebilirliğinin Değerlendirilmesi

Termojel formülasyonlarının jelleşme süreleri termojelin eklem içerisine uygulandıktan ne kadar süre sonra jelleştiğini gösteren önemli bir parametredir. Termojelin eklem içine uygulandıktan sonra mümkün olan en kısa sürede jelleşmesi arzu edilmektedir. Çünkü jelleşme süresinin uzaması durumunda eklem içine uygulanan mikropartikül/termojel karışımından partiküllerin uzaklaşarak eklem bölgesinden ayrılmasına neden olabilir. Bu nedenle hazırlanan termojel formülasyonlarının jelleşme süreleri incelenmiş ve formülasyonların jelleşme süresinde ise iki parametrenin etkili olduğu görülmüştür. Bu parametreler viskozluk ve jelleşme ajanı içeren çözelti konsantrasyonunun pH değeridir ($p < 0,05$). Örneğin ASP'nin % 15 konsantrasyonu kullanıldığında ASP ve kitozan arasındaki etkileşiminin yetersiz olmasından dolayı jelleşme süresinin oldukça uzun (> 30 dak) olduğu görülmüştür. ASP konsantrasyon değeri % 30-45' e çıktığında ise kitozan ve

ASP etkileşimi artarak ve bu süre 5 dakikaya kadar düşmüştür. Ancak konsantrasyonun % 60'a çıkması ile ASP çözeltisinin pH değeri düşmüş ve kitozan çözeltisini nötralleştirmek için gerekli çözelti miktarı artmıştır. Bu nedenle çözelti viskozluğunda azalma gerçekleşmiş ve jelleşme süresi 30 dakikayı aşmıştır. Kitozan termojeller üzerinde yapılan başka bir çalışmada benzer sonuçlar bulunarak jelleşme süresi üzerinde etkili faktörlerin eklenen baz çözeltisi miktarı, viskozite ve sıcaklık gibi parametreler olduğunu belirtmişlerdir (Nair, 2007)

Termojel formülasyonların enjekte edilebilirliği termojelin enjektör yardımıyla eklem içine uygulanma işlemi için kritik parametredir. Bu nedenle hazırlanan termojel formülasyonlarının enjekte edilebilirliği incelenmiş ve hazırlanan termojellerin enjekte edilebilirliklerinin doğrudan viskoziteleri ile ilişkili olduğu görülmüştür. Aşırı viskoz olan yüksek molekül ağırlıklı kitozan termojel enjektörden çıkışı gerçekleşmemiştir. T1, T3, T4, T5 ve T6 formülasyonları 1kg'lık bir kuvvet uygulandığında enjektörden 85 saniyeden daha az sürede tamamen çıkmıştır.

4.5. Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Belirlenen Morfolojik Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Hazırlanan mikropartikül, termojel ve mikropartikül/termojel formülasyon karışımlarının morfolojik analizini yapmak için SEM görüntüleri çekilmiş ve yapılan incele sonrasında kullanılan polimer ve hazırlama yönteminin partiküllerin morfolojisini değiştirdiği görülmüştür. İlk olarak iyonik jelasyon yöntemi ile üretilen kitozan mikropartikül formülasyonları incelendiğinde partiküllerin küresel yapıda olmadığı ve düzensiz şekilli oldukları belirlenmiştir. Yapılan literatür incelemelerinde de iyonik jelasyon yöntemi ile üretilen kitozan partiküllerin yaptığımız çalışmadakine benzer şekilde düzensiz şekilli oldukları görülmüştür (Martins ve ark., 2012; Yoksan ve ark., 2010). PLGA mikropartiküllerin SEM görüntüleri incelendiğinde ise partiküllerin küresel yapıya ve pürüzsüz bir yüzeye sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca PLGA mikropartiküllerinde sürfaktan madde olarak PVA ya da CTAB'ın kullanılmasının partikül morfolojik özelliklerini değiştirmedığı belirlenmiştir. Yapılan literatür incelemesinde emülsifikasyon-solvent buharlaştırma tekniği ile üretilen PLGA partiküllerinin çalışmamızda elde ettiğimiz gibi küresel yapıda ve pürüzsüz yüzey özelliklerine sahip oldukları görülmüştür (İsmail ve ark.,

2012; Ko ve ark., 2013; Zhang ve Gao, 2007; Zhang ve ark., 2011). Bölüm 1.5.2.2.' de bahsedildiği gibi eklem içine uygulanan partiküler sistemlerin küresel yapıda olduğu zaman uygulama bölgesindeki inflamasyonu daha az tetiklediği göz önüne alınırsa PLGA partiküllerin küresel yapısının bir avantaj olduğu düşünülmektedir. Hazırlanan termojel formülasyonlarının morfolojik incelemesi yapıldığında porlu bir yapının olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar incelendiğinde kitozan termojellerin 37°C' de jelleştikten sonra SEM görüntüleri incelendiğinde yaptığımız çalışmadakine benzer oldukça porlu yapılar görülmüştür (Arunkumar ve ark., 2016; Monette ve ark., 2016). Ayrıca farklı konsantrasyonlarda ASP içeren formülasyonların poroz yapılarında değişiklikler tespit edilmiştir. % 30, % 45 ve % 60 konsantrasyonlarındaki ASP çözeltileri kullanılarak hazırlanan termojellerin, konsantrasyon artışına bağlı olarak por duvarlarında kalınlaşmanın olduğu gözlenmiştir. ASP konsantrasyonuna bağlı olarak gözlenen por duvarlarındaki kalınlaşmanın sebebinin artan ASP miktarı ile ASP-kitozan arası etkileşimlerin artmasının olduğu düşünülmektedir. SEM görüntülerinin incelendiği son grup ise mikroküre-termojel karışım formülasyonlarıdır ve morfolojik incelemeler sonucunda termojel ve mikropartiküllerin fiziksel olarak birbirlerini etkilemedikleri ve homojen bir karışım elde edildiği görülmüştür.

4.6. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetresi (DSC) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çeşitli madde ve materyallerin fiziksel özellikleri hakkında bilgi sağlayan bir çok analitik metot vardır ve bunlardan biri olan DSC, farmasötik alanda yaygın olarak kullanılan termal analiz metodudur. Maddelerin kristal ya da amorf halleri, camı geçiş sıcaklığı ve erime özellikleri, rekristalizasyon, dekompozisyon ve gaz çıkışı gibi özellikleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Ayrıca aynı materyaller ile yapılan farklı örneklerin benzerlik ve farklılıkları hakkında bilgi verir. Daha spesifik olarak etkin madde-polimer etkileşimleri, etkin maddenin polimer matriksindeki kristal ya da amorf hali hakkında bilgi vermektedir (Turk ve ark., 2014; Zhang ve Gao, 2007). Formülasyonların karakterizasyonu için DSC analizleri yapılmıştır. Kitozan ve PLGA mikropartikülleri ile kitozan termojellerinin DSC analizlerine dair değerlendirmeler aşağıda gruplar halinde yer almaktadır.

Kitozan Mikropartiküller

PLGA mikropartiküllerinin DSC incelemesi için öncelikle formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin DSC analizi yapılmıştır. Kitozanın DSC termogramına bakıldığında 309,18 °C’ de egzotermik bir pik görülmüştür. Literatür incelemesi sonucunda bu pikin kitozanın degradesyonuna ait olduğu belirlenmiştir (Guinesi ve Cavalheiro, 2006; Kawadkar ve Chauhan, 2012; Sarmento ve ark., 2006). Bölüm 1.5.4.1’ de de bahsedildiği gibi kitozan erimeden degrade olmaktadır, bu nedenle üretim prosesi kitozanın eritilmesi değil asidik bir çözünme çözünmesi esasına dayanmaktadır. TPP’ nin DSC termogramı incelendiğinde ise 120,31 ve 194,27 °C’ lerinde iki tane egzotermik pik gözlenmiştir. TPP’ nin termal analizlerinin yapıldığı başka çalışmalarda da TPP’ye ait iki endotermik pik gözlenmiştir (Govindasamy ve ark., 2013; Kouchak ve ark., 2015). TPP’ nin erime noktasının 622 °C olduğu (Peery, 2016) düşünülürse bu piklerin erime ile ilgisi olmadığı söylenebilir.

Hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonlarının DSC termogramları formülasyonda yer alan maddelerin fiziksel karışım halinde elde edilen DSC termogramları ile karşılaştırıldığında, mikropartikül formülasyonlarında kitozana ait 309,18 °C ’de görülen degradesyon pikinin Şekil 3.35 ve 3.36’ da görüldüğü gibi yaklaşık 250 °C’ ye kaydığı görülmüştür. Bu kaymanın nedeni, saf kitozanın azot grupları serbest olduğu zaman süstitüe olmasına oranla daha yüksek sıcaklıkta denatüre olması şeklinde açıklanabilir (Kittur ve ark., 2002). Çünkü kitozan ve TPP arasındaki elektriksel etkileşimler Bölüm 1.5.4.3’de görüldüğü gibi kitozanın azot atomu ve TPP’ nin oksijen atomu arasında gerçekleşmektedir. Kitozan mikropartiküllerinde gözlenen bu pik kayması başka çalışmalarda da görülmüştür. Kitozanın genipin ile çapraz bağlanması ile hazırlanan partiküllerde kitozanın 324 °C’ de gözlenen denatürasyon piki 270 °C dolayına kaymıştır (Kawadkar ve Chauhan, 2012).

TPP konsantrasyonunun formülasyonlara etkisi DSC termogramlarında incelendiğinde Şekil 3.35’ de görüldüğü gibi TPP konsantrasyonunun azalmasıyla kitozanın egzotermik pikinde küçülme gözlenmiş ve TPP konsantrasyonu % 0,25’e düşünce pikin tamamen kaybolduğu görülmüştür. Bunun sebebinin ise düşük konsantrasyondaki TPP’ nin kitozan ile iyonik jelasyonu için yeterli olmaması ve bağlanmanın gerçekleşmeyerek kitozanın ortamdan uzaklaşması olduğu düşünülmektedir. Şekil 3.36’a bakıldığında ise kitozan miktarının DSC

termogramlarında önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

DSC termogramlarında etkin madde ile polimer arası etkileşimlerin incelenmesi amacıyla formülasyon DSC termogramları ile formülasyonda yer alan maddelerin fiziksel karışımlarına ait DSC termogramları (Şekil 3.30) karşılaştırılmış ve tenoksikamın, kitozanın ve TPP'nin kendilerine özgü piklerin her iki termogramda da benzer olduğu görülmüş ve etkin madde ve yardımcı maddeler arasında herhangi bir etkileşimin olmadığı belirlenmiştir. Ancak formülasyonlara ait termogramlarda tenoksikama özgü piklere rastlanması etkin maddenin kristal formunu koruduğunu göstermektedir. Bunun sebebinin ise; tenoksikamın hidrofobik yapısı gereği mikropartikül üretim prosesinde tenoksikam kitozan çözeltisi içerisinde çözülmeyp süspande edilmesidir. Başka bir suda çözünürlük problemi olan flurbiprofen ile yapılan çalışmada etkin maddenin disperse edilmesinden kaynaklı olarak kristal yapısını koruduğu ve formülasyonların DSC termogramında piklerinin yer aldığı görülmüştür (Kawadkar ve Chauhan, 2012). Aynı şekilde hidrofobik özellikteki aseklofenak ile yapılan kitozan partiküllerin DSC termogramlarında etkin madde pikleri görülmüştür (Rao ve ark., 2010).

PLGA Mikropartiküller

PLGA mikropartiküllerinin DSC analizi için öncelikle formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin DSC termogramları elde edilmiştir. Öncelikle farklı PLGA tiplerinin incelemeleri yapılmış ve PLGA (50:50)'nin 46,97 °C'de ve PLGA (75:25)'in 47,88 °C'de pik verdiği görülmüştür. Bu piklerin polimerin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) nedeniyle oluştuğu ve polimerin amorf yapısından dolayı daha yüksek sıcaklıklarda herhangi bir endotermik erime piki oluşmadığı düşünülmektedir. Literatür incelemesi yapıldığında bu sonucu destekler nitelikte çalışmalar bulunmuştur. Falco ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada PLGA (50:50)'nin 40-45 °C aralığında camsı geçiş sıcaklığının gözlemlendiği ve 300 °C'nin üzerinde dekompoze oluncaya kadar herhangi bir pik tespit edilmemiştir (2013). Ayrıca yapılan başka çalışmalarda da benzer olarak PLGA (75:25, MA 20 kDa)'in 50 °C'de ve PLGA (50:50, MA 40–75 kDa) 41,9 °C'de camsı geçiş sıcaklığına ait piki gözlemlenmiştir (Türk ve ark., 2014; Zhang ve Gao, 2007). Formülasyonda yer alan yardımcı maddeler ile etkin madde arasında herhangi bir etkileşimin olup olmadığını anlamak için formülasyonda yer alan maddelerin fiziksel karışımları hazırlanarak Şekil 3.32, 3.33 ve 3.34'de gösterildiği gibi DSC termogramları incelendiğinde tenoksikam, PLGA ve PVA'nın kendilerine has pikleri gösterdiğinin sürfaktan olarak PVA'nın kullanıldığı formülasyonlarda herhangi bir etkileşimin olmadığı belirlenmiştir. Sürfaktan olarak

CTAB'ın kullanıldığı formülasyonda yer alan maddelerin DSC termogramları fiziksel karışımın termogramı ile karşılaştırıldığında CTAB ve PLGA' nın kendilerine has pik değerlerini korudukları ancak tenoksikamın erime derecesine ait pikin 223,26 °C' den farklı termogramlarda 199,12 ve 205,07 °C' ye kaydığı görülmüştür. Piklerde gözlenen bu kayma eğilimi CTAB ile tenoksikam arasında bir etkileşme ihtimalini doğurmuş ancak ilave olarak yapılan FTIR analizi sonrasında formülasyonlara ait spektrumlar incelendiğinde etkin maddeye ait piklerin belirgin varlığı herhangi bir kimyasal etkileşim varlığı ihtimalini ortadan kaldırmıştır.

Şekil 3.38, 3.39 ve 3.40' a bakıldığında mikropartikül formülasyonlarının DSC termogramlarında etkin maddeye ait herhangi bir erime ve dekompoze olma piki görülmemektedir. Bu durumdan yola çıkarak etkin maddenin polimerik materyal içerisinde amorf halde olduğu düşünülmektedir. Farklı etkin maddelerle yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin lornoksikamın PLGA içerisine enkapsüle edildiği bir çalışmada DSC termogramında etkin maddeye ait herhangi bir pik görülmemiştir (Zhang ve ark., 2011). Temozolamid ile yapılan bir çalışmada da etkin maddenin PLGA matrisinde amorf halde olduğu DSC termogramında bir pik tespit edilmemiştir (Zhang ve Gao, 2007). Ayrıca stabilizan maddenin PVA ya da CTAB olması etkin madde piklerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamış ve böylece enkapsülasyon sürecinde etkin maddenin amorf halini her iki stabilizan için de koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca PVA ve CTAB'a ait herhangi bir pikin formülasyonların DSC termogramlarında yer almaması partiküllerin başarılı bir şekilde yıkandığına ve ortamdan uzaklaştırıldıklarını göstermektedir. PLGA miktarı ve tipinin de etkin maddenin polimerik materyal içerisindeki amorf haline herhangi bir etkisinin olduğu görülmemiştir. Ancak Şekil 3.37 'de yer alan P1 formülasyonuna bakıldığında polimerin camsı geçiş sıcaklığının yanında tenoksikama ait erime ve dekompoze olma pikleri de görülmektedir. P1 formülasyonunun düşük karıştırma hızında üretildiği göz önüne alındığında bu karıştırma hızının enkapsülasyon için yeterli olmadığı ve etkin maddenin kristal formda kaldığı düşünülmektedir.

Kitozan Termojeller ve Mikropartikül/Termojel Karışımları

Çalışmamızda hazırladığımız termojel formülasyonlarının termal incelemeleri kitozan ve ASP fiziksel karışımı ile termojel formülasyonlarının analizi ile elde edilen DSC termogramlarının karşılaştırması ile yapılmıştır. Şekil 3.31' de gösterildiği gibi fiziksel karışıma ait DSC termogramında ASP ve kitozan kendilerine has pikleri vermiş iken termojel formülasyonlarına ait DSC termogramlarında Şekil 3.41' de gösterildiği gibi farklılıklar meydana gelmiştir. Termogramlarda meydana gelen bu

farklılıkların nedeninin ise termojel oluşumu sırasında ASP ve kitozan arasında gerçekleşen elektriksel etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Son olarak, hazırladığımız mikropartikül/termojel kombinasyon formülasyonları için DSC analizi yapılmış ve elde edilen termogramlar incelendiğinde termojel ile mikropartikül arasında herhangi bir etkileşimin olmadığı anlaşılmıştır.

4.7. Formülasyonların Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

FTIR spektrofotometre incelemeleri maddelerin kimyasal bağları ve fonksiyonel gruplarının spesifik vibrasyonlarının infrared ışınlarını absorblaması temeline dayanmaktadır ve farmasötik alanda etkin madde-polimer arası etkileşimlerin incelenmesinde kullanılmaktadır (Gupta ve ark., 2014). Kitozan ve PLGA mikropartikülleri ile kitozan termojellerinin FTIR analizlerine dair değerlendirmeler aşağıda gruplar halinde yer almaktadır.

Kitozan Mikropartiküller

Yapılan literatür incelemelerinde kitozanın $3700-2800\text{ cm}^{-1}$ ve $1700-400\text{ cm}^{-1}$ olmak üzere iki temel alanda spesifik piklerini verdiği görülmüştür (Antoniou ve ark., 2015; Dudhani ve Kosaraju, 2010; Kawadkar ve Chauhan, 2012). Daha ayrıntılı bakılacak olursa Luo ve arkadaşları kitozanın FTIR spektroskopisini incelediklerinde 1025 cm^{-1} 'de C-O gerilmesi, 1375 cm^{-1} 'de $-\text{CH}_3$ simetrik deformasyonu, 1418 cm^{-1} 'de $-\text{CH}_2$ bükülmesi, 1586 cm^{-1} 'de $-\text{NH}$ bükülmesi ve amid-II kaynaklı C-N gerilmesi, 1648 cm^{-1} 'de amid-I kaynaklı C=O gerilmesi ve 3358 cm^{-1} 'de O-H gerilmesinden kaynaklı pikler görülmüştür (2010). Şekil 3.43'ye bakıldığında bu pikler 1023 cm^{-1} , 1317 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} , 1582 cm^{-1} , 1636 cm^{-1} ve 3339 cm^{-1} 'de görülmektedir.

Kitozan-TPP iyonik jelasyonu sonucu oluşan partiküllerin FTIR analizlerine bakılırsa 3339 cm^{-1} 'de görülen pikin genişlediği görülmüştür. Bu genişlemenin kitozan-TPP arasında oluşan hidrojen bağlarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 1636 cm^{-1} ve 1582 cm^{-1} 'de görülen amid gruplarının pikleri 1606 cm^{-1} ve 1545 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bunun sebebinin ise TPP'nin fosforik grupları ile kitozanın amino grupları arasındaki elektriksel etkileşimler olduğu düşünülmektedir. Literatür

bilgisi ile karşılaştırıldığında benzer sonuçların elde edilerek kitozan ve TPP etkileşiminden kaynaklı olarak piklerde kayma ve değişimlerin olduğu görülmüştür (Antoniou ve ark., 2015; Dudhani ve Kosaraju, 2010; Luo ve ark., 2010).

Kitozan mikropartikül formülasyonlarına ait FTIR analizleri incelendiğinde etkin maddeye ait piklerin ayırt edilebilir ve bozulmamış bir şekilde spektrumlarda yer aldığı görülmektedir. Bu da tenoksikam ve yardımcı maddeler arasında herhangi bir etkileşimin olmadığını göstermektedir.

PLGA Mikropartikülleri

PLGA'ya ait FTIR spektrumlarına ait literatür bilgisine bakıldığında Ganji ve Abdeknhodaie'nin yapmış oldukları çalışmada 745 cm^{-1} ' de CH bükülmesi, 1095 ve 1180 cm^{-1} ' de C-O gerilmesi, 1395 cm^{-1} ' de CH bükülmesi, 1750 cm^{-1} ' de C=O ester gerilmesi, 2900 cm^{-1} ' de CH_2 bükülmesi ve 3550 cm^{-1} ' de terminal OH gruplarının titreşimlerinden kaynaklı karakteristik piklerin olduğu görülmüştür (2010). Yapılan başka bir çalışmada ise 1070 cm^{-1} , 1758 cm^{-1} , 2954 cm^{-1} ve 3432 cm^{-1} dalga boylarında pikler görülmüştür (Gupta ve ark., 2014). Şekil 3.45 ve 3.46' a bakıldığında PLGA(50:50) ve PLGA(75:25)'e ait FTIR spektrumları görülmektedir. 747 cm^{-1} ' de CH bükülmesi, 1045 ve 1079 cm^{-1} ' de C-O gerilmesi, 1381 cm^{-1} ' de CH bükülmesi, 1744 cm^{-1} ' de C=O ester gerilmesi, 2946 ve 2994 cm^{-1} CH_2 bükülmesi ve 3550 cm^{-1} ' de terminal OH grupların titreşimlerinden kaynaklı pikler görülmüştür. Şekil 3.58 ve 3.59' a bakıldığında hem tenoksikama hem de PLGA' ya ait spesifik piklerin bir arada olduğu görülmektedir. Buradan yola çıkarak polimerin ve etkin maddenin kendilerine özgü titreşimleri korudukları ve herhangi bir etkileşimde bulunmadıkları söylenebilir. Wei ve arkadaşları PLGA ve ibuprofen ile yapmış oldukları çalışmada mikropartiküllerin FTIR spektroskopisini incelediklerinde hem etkin madde hem de polimere ait pikleri görmüşler ve polimer-etkin madde etkileşiminin olmadığına ve etkin maddenin başarılı bir şekilde enkapsüle olduğu sonucuna varmışlardır (2012). Gupta ve arkadaşları da paklitakseli PLGA'ya enkapsüle etmeye çalıştıkları formülasyonların incelemesinde aynı sonuca varmışlardır (2014).

Şekil 3.52'ye bakıldığında ise etkin maddeye ait piklerin çok zayıf olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin ise P8 ve P11 formülasyonlarının sahip olduğu düşük enkapsülasyon etkinliği nedeni ile bünyelerinde düşük miktarda etkin madde barındırmaları olduğu düşünülmektedir. Tekrar Şekil 3.52, 3.53 ve 3.54' e bakıldığında CTAB ve PVA'ya ait piklerin olmaması üretimin yıkama basamağında

başarılı bir şekilde ortamdan uzaklaştırıldıklarını göstermektedir.

Kitozan Termojeller ve Mikropartikül/Termojel Karışımları

Kitozan termojel formülasyonlarını hazırlama prensibi kitozan ile ASP arasındaki elektriksel çekim kuvvetleri esasına dayanmaktadır ve herhangi bir kovalent bağ oluşumu istenmemektedir. Bu nedenle hazırladığımız formülasyonlar için FTIR analizi yapılmış olup; termojel formülasyonlarının spektrumlarında Şekil 3.55, 3.56 ve 3.57’ de görüldüğü gibi hem kitozana ait hem de ASP’ye ait karakteristik piklerin spektrumda yer aldığı ancak 2000-3500 cm^{-1} bandında bir artan hidrojen bağlarından kaynaklı bir genişleme olduğu görülmüş ve herhangi bir kimyasal bağ oluşumuna dair başka bir pikin meydana gelmediği anlaşılmıştır (Contri ve ark., 2014). Son olarak hazırlanan mikropartikül/termojel kombinasyonların FTIR analizi yapılmış ve elde edilen spektrumlarda mikropartikül ve termojel formülasyonlarına ait pikler bir arada görülmüş, herhangi bir kimyasal bağ oluşumuna işaret edecek pikin meydana gelmediği anlaşılmıştır.

4.8. Formülasyonların Etkin Madde Çıkış Profillerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

NSAİİ’ler osteoartrit tedavisinde klinikte oldukça fazla kullanılan ilaçlar olmalarına rağmen sahip oldukları yan etkiler sebebiyle uzun süreli kullanımlarında hasta uyuncu açısından sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle etkin maddenin doğrudan ilgili eklem içerisine verilmesi gündeme gelmiş ancak etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak eklem bölgesinden hızlıca uzaklaştırıldığı görülmüştür. Etkin maddenin eklem içerisinden hızlıca uzaklaşmasını engellemek ve uzun süreli salımını sağlamak amacıyla tez çalışmamız kapsamında mikropartikül/termojel kombinasyon formülasyonları geliştirilmiş ve etkin madde salım özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla formülasyonların in vitro çözünme hızını tayini eklem pH’ sı ve geliştirilen İA salım sistemleri ile yapılan çalışmalar göz önüne alınarak PBS 7,4 tamponu kullanılarak yapılmıştır (Thing, 2013; Kawadkar 2013; Bedouet, 2014). Çalışmamızda etkin madde salım özellikleri saf etkin madde, kitozan mikropartiküller, PLGA mikropartiküller ve mikropartikül/termojel formülasyonları olacak şekilde dört grup altında incelenmiştir.

Tenoksikamın Çözünme Profili

Tenoksikamın PBS 7,4 ortamında 37 °C ve 50 rpm karıştırma hızındaki çözünme profilini incelemek için belirli zaman aralıklarında alınan numunelerin spektrofotometrik ölçümü yapılarak zamana karşı % kümülatif açığa çıkan etkin madde miktarları grafiğe geçirilerek salım profili oluşturulmuştur. Tenoksikam için elde edilen profile bakıldığında etkin maddenin yaklaşık % 60' ının 2 saat içerisinde çözündüğü, kalan % 40' lık kısmın çözünme süresinin ise 12. saate kadar uzadığı görülmüştür. Tenoksikamın 12 saat içerisinde tamamen çözündüğü dikkate alındığında eklem içinde uzun süreli salımını sağlamak için salım özelliklerinin modifiye edilme gerekliliği bir kez daha ortaya çıkmıştır.

Kitozan Mikropartiküller

Kitozan mikropartiküllerden tenoksikam çıkış profilleri incelendiğinde formülasyonların benzer etkin madde çıkış profillerine sahip olduğu ve ilk 6 saat içerisinde etkin maddenin yaklaşık % 80'inin kademeli bir şekilde önemli bir burst salımı olmadan gerçekleştiği görülmüştür. Partikül içerisinde kalan tenoksikamın ise 12. saate kadar salımının devam ettiği görülmüştür. Kitozan mikropartiküller üzerine yapılan etkin madde çıkış hızı çalışması sonucunda formülasyonlara ait k salım hızı sabitleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve CH1, CH4 ve CH5 formülasyonlarının etkin maddenin salım özelliklerini değiştirmediği anlaşılmıştır ($p>0,05$). Üretim proseslerinde kitozan ve TPP çözelti pH değerlerinin değiştirilmesiyle hazırlanan CH1-CH5 arasındaki formülasyonlar incelendiğinde ise etkin madde salım özellikleri üzerine etkili olan faktörün pH olduğu görülmüştür. CH1, CH4 ve CH5 formülasyonlarının tenoksikam salımı üzerinde etkili olmamalarının nedeninin katyonik kitozan ve anyonik TPP tuzunun etkileşmesinin yetersiz olduğu pH değerlerinde üretilmiş olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. CH1, CH4 ve CH5 formülasyonları haricindeki kitozan mikropartiküllerinin etkin madde salım profilini değiştirdiği ($p<0,05$) ancak formülasyonlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde karıştırma hızı, TPP konsantrasyonu ve kitozan konsantrasyonu olmak üzere üretim parametrelerinin değiştirilmesinin salım profili üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak tenoksikamın kitozan mikropartikül içerisine enkapsüle edilmesiyle etkin madde salım özellikleri üzerine etkili olunmuş ancak arzu edilen uzatılmış salım profili elde edilememiştir. Tenoksikamın salımının modifiye edilerek eklem içerisine uygulanmasına olanak verecek şekilde uzun süreli salımı sağlaması amacıyla kitozana göre daha lipofilik özellikteki PLGA polimeri seçilerek yeni formülasyonlar tasarlanmıştır.

PLGA Mikropartikülleri

PLGA polimeri ile hazırlanan formülasyonlarda karıştıma hızı, PVA miktarı, CTAB miktarı, PLGA miktarı ve tipi değiştirilerek partiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Mikropartiküllerin üretimleri sırasında değiştirilen bu parametrelerin etkin madde salım özellikleri üzerine etkileri incelendiğinde çeşitli değişimlere neden oldukları görülmüştür. İlk olarak PLGA miktarı % 1’de sabit tutularak 400 rpm ve 800 rpm olmak üzere iki farklı karıştırma hızında partiküller üretilmiş ve karıştırma hızının salım profili üzerine etkili olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). İkinci parametre olarak PVA miktarı değiştirilerek % 1, % 3 ve % 5 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda üretim yapılmıştır. Zamana karşı etkin maddenin % kümülatif açığa çıkan madde miktarı grafiğine bakıldığında PVA miktarındaki artışın salımı biraz yavaşlattığı görülmüş ancak etkin maddenin salım özelliklerinde gerçekleşen bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı anlaşılmıştır ($p>0,05$). Daha sonraki basamakta ise PVA konsantrasyonu % 5’ de sabit tutularak PLGA miktarı % 1, % 2 ve % 3 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda çalışılarak mikropartiküllerin salım özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. % 1 PLGA içeren formülasyon (P4) ile saf etkin maddenin salım özellikleri karşılaştırıldığında, P4 formülasyonunun salım hızının saf etkin maddenin çözünme hızından daha fazla olduğu görülmüştür. P4 formülasyonunda etkin madde salımının hızlı olmasının nedeninin ise polimer:etkin madde oranının yeterli olmaması ve küçülen partikül boyutu ile artan yüzey alanından kaynaklandığı düşünülmektedir. PLGA miktarı % 2’ ye çıkarıldığında etkin maddenin yaklaşık % 50’ sinin 24 saat içerisinde açığa çıktığı ve etkin madde salımının 30 güne kadar sürdüğü görülmüştür. PLGA konsantrasyonu % 3’ çıkarıldığında da benzer bir profil elde edilmiş ancak 24 saatten sonra salımın daha yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Formülasyonlarda kullanılan sürfaktan maddenin etkin madde salım hızı üzerine etkisi incelenmiş ve PLGA mikropartiküllerinin salım özellikleri üzerine sürfaktan tipinin de etkili olduğu görülmüştür. PVA yerine CTAB’ın kullanıldığı P7, P8 ve P9 formülasyonlarında salım özelliklerinin değişerek burst salımının azaldığı ve salımın daha yavaş gerçekleştiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu formülasyonlarda etkin maddenin yaklaşık % 25’inin ilk 24 saatte açığa çıktığı ve etkin madde salımının (% 60) 30 güne kadar uzadığı görülmüştür. Yapmış olduğumuz literatür incelemelerinde elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, sürfaktan olarak CTAB’ın kullanıldığı formülasyonlarda, PVA kullanılan formülasyonlara oranla enkapsüle edilen etkin madde miktarının azaldığı düşünülmektedir. Polimer matriksinde azalan etkin madde miktarı ile salım hızı yavaşlamış ve burst salım bariz şekilde azalmıştır (Sonaje

ve ark., 2007). PLGA mikropartikülleri üzerinde incelenen son parametre ise PLGA tipi olmuştur. PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) olmak üzere iki farklı PLGA tipi kullanılarak partiküller hazırlanmış ve salım özellikleri incelenmiştir. PLGA (75:25) polimerinin kullanıldığı P10, P11 ve P12 formülasyonların salım hızları diğer parametrelerin aynı tutulduğu P7, P8 ve P9 formülasyonları ile mukayese edildiğinde etkin madde salımını azaldığı görülmüştür ($p < 0,05$). Salımda gerçekleşen bu yavaşlamanın nedeninin PLGA(75:25) bileşiminde daha yüksek oranda laktik asit bulunması ve laktik asitin glikolik asite göre daha lipofilik özellikte olduğu için yine lipofilik bir madde olan tenoksikamın salımını yavaşlattığı düşünülmektedir. Budhian ve arkadaşları da yapmış oldukları çalışmada PLA ve PLGA polimerlerini kullanarak lipofilik özellikteki haloperidolu enkapsüle etmiş ve salım özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda bizim çalışmamızı destekler nitelikte polimer içeriğindeki laktik asit miktarının artmasıyla salımda yavaşlamanın gerçekleştiğini bulmuşlardır (2008). Yine yapılan başka bir çalışmada tenoksikama benzer bir şekilde nötr pH'da çözünürlüğü düşük olan norfloksasin ile yapılan bir çalışmada PLGA bileşimindeki laktik asit oranı arttıkça salımda yavaşlamanın olduğu görülmüştür (Jeon ve ark., 2000).

Mikropartikül/Termojel Kombinasyon Formülasyonları

Hazırlanan mikropartikül formülasyonlarının termojellerle karıştırılarak eklem içine uygulandığı zaman salım özelliklerinde bir değişime neden olup olmadığı belirlemek amacıyla in vitro etkin madde salım çalışması yapılmıştır. Bu amaçla termojel formülasyonları içerisinde T4 formülasyonu seçilerek saf etkin madde, CH3 kodlu kitozan mikropartikülü ve P6, P8 ve P11 kodlu PLGA mikropartikülleri ile kombinlenerek salım çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda termojel formülasyonunun mikropartiküllerin etkin madde salım özellikleri üzerine etkili olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

Formülasyonların Etkin Madde Salım Kinetikleri

Kitozan ve PLGA mikropartikül formülasyonları ile mikropartikül/termojel kombinasyon formülasyonlarının etkin madde salım hızı çalışmaları yapıldığında yüzde açığa çıkan etkin madde miktarı zamana karşı grafiğe geçirilmiş ve doğrusal bir trend yakalanamamıştır. Formülasyonlarda etkin madde çıkış özelliklerinin birbirleri ile karşılaştırılmasının yapılabilmesi için sıfır derece, birinci derece, Hixson Crowell, Higuchi ve Korsmeyer Peppas gibi çeşitli matematiksel modeller kullanılarak doğrusal doğrular ve bu doğrulara ait parametreler elde edilmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızda hazırladığımız kitozan mikropartikül formülasyonlarından etkin madde salım hızı çalışmaları yapılarak etkin madde çıkış özellikleri matematiksel olarak değerlendirildiğinde en yüksek r^2 değerinin birinci derece kinetiği, Higuchi kinetiği ve Hixson-Crowell kinetiği ile elde edildiği, ancak RSM değerleri incelendiğinde en düşük RSM değeri ile Hixson-Crowell kinetiğinde elde edildiği için bu kinetiğe uyumun sağlandığı düşünülmektedir. Hixson-Crowell kinetiğine uyum sağlayan sistemlerde genellikle salımın partikülün yüzey alanında ve çapında meydana gelen değişikliklerden etkilendiği yani erozyonun ve difüzyonun salımda etkili olduğu söylenmektedir (Aydin ve Pulat, 2012; Sugita ve ark., 2013). Kitozan partiküllerin de salımlarında mikropartiküllerin şişme özelliğinin etkisi olduğu dikkate alındığında Hixson-Crowell kinetiğine uyumun mümkün olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca kitozan mikropartiküllerinin Korsmeyer Peppas kinetik denkleminde elde edilen n değerleri 0,5' den küçük bulunmuş ve etkin madde salımında difüzyonun baskın olduğu belirlenmiştir (Dash ve ark., 2010).

PLGA bazlı mikropartiküllerden etkin madde çıkış özellikleri matematiksel kinetikler ile incelendiğinde salım profilinin Higuchi modeline uyum gösterdiği belirlenmiştir. Genellikle matriks sistemlerde bu uyum hazırladığımız PLGA bazlı mikropartiküllerde de görülmüştür. Hazırladığımız farklı tipteki formülasyonlarda sürfaktan olarak PVA'nın kullanıldığı formülasyonlarda determinasyon katsayısı 0,704 ve 0,928 arasında bulunurken, CTAB'ın kullanıldığı tüm formülasyonlarda bu değer 0,912 ve 0,956 arasında bulunmuştur. Bu sonuç PLGA bazlı mikropartiküllerden etkin madde salım profili üzerine sürfaktan madde tipinin etkili olduğunu göstermiştir. İn vitro salım hızı çalışmalarıyla da sonuçlar desteklendiğinde CTAB'ın matriks yapıda bir partiküler sistemde etkin maddenin enkapsülasyon etkinliğini artırdığını göstermektedir.

Yapılan literatür incelemeleri, PLGA bazlı matriks sistemlerden etkin madde salımının genellikle polimerin degradasyonu ve etkin maddenin matriksten difüzyonu olmak üzere iki mekanizma ile gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak küçük moleküllü etkin maddelerde salımın esas olarak difüzyon kontrollü olduğu belirtilmiştir (Dash ve ark., 2010; Hines ve Kaplan, 2013). Hazırladığımız PLGA bazlı mikropartiküllerden etkin madde salımı Korsmeyer Peppas kinetiği ile değerlendirildiğinde elde edilen n değerleri 0,5' den küçük bulunmuş ve etkin madde salımının difüzyon kontrollü olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda; mikropartikül/termojel kombinasyon formülasyonlarından etkin madde salım kinetikleri değerlendirildiğinde, salım profilinin Higuchi modeline uyum sağladığı ve etkin maddenin termojel sistemden salımının difüzyon mekanizması ile gerçekleştiği belirlenmiştir.

4.9. Formülasyonların Ön Stabilité İncelemesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tez çalışmamız kapsamında hazırlanan kitozan ve PLGA mikropartikül formülasyonlarının ön stabilite incelemeleri 3 ay süreyle karanlık ortam koşullarında +25 °C’de % 60 bağıl nem içeren, +40 °C’ de % 75 bağıl nem içeren ve +4 °C’ de buzdolabı ortamlarında incelenmiş ve 0. ile 3. ay sonuçları karşılaştırılarak saklama koşullarının mikropartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, partikül büyüklük dağılımı ve zeta potansiyeli üzerine etkileri Çizelge 3.22 ve 3.23’ de gösterildiği gibidir.

Kitozan Mikropartiküller

Kitozan mikropartikül formülasyonlarının +4, + 25 ve +40 °C olmak üzere üç farklı ortamda ön stabilite incelemesi yapılmış ve mikropartiküllerin partikül büyüklükleri, partikül büyüklük dağılımları ve zeta potansiyeli değerlerin sıfırıncı ay ile üçüncü ay ölçümlerinde değişimin olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Mikropartiküllerin üç ay sürecindeki partikül büyüklük değişimlerine bakıldığında +4 ve +25 °C sıcaklık değerlerindeki tüm formülasyonların partikül büyüklüklerinde Çizelge 3.23’ de gösterildiği gibi bariz bir artış gerçekleşmiştir. Benzer bir şekilde mikropartiküllerin partikül büyüklük dağılımını ifade eden SPAN değerinde de tüm formülasyonlarda artış gerçekleşmiştir. Hem partikül büyüklüğünde hem de partikül büyüklük dağılımında artışın olması, kitozan bazlı mikropartiküllerde zaman içerisinde agregasyonun meydana gelmesini ve bunun sonucunda partiküllerin büyümesi ve partikül büyüklük dağılımının genişlemesini göstermektedir. Ancak sıcaklığın +40 °C’ ye çıkmasıyla mikropartikül boyutunda üç aylık süreçte küçülme meydana gelmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuca benzer şekilde Morris ve arkadaşları kitozan nanopartikülleri için yapmış oldukları on iki aylık stabilite incelemesinde +4 ve +25 °C sıcaklık değerlerinde birinci aydan itibaren agregasyon nedeniyle partikül büyümesi gözlemlenmişler ancak, +40 °C sıcaklık değerinde yapılan incelemede

kitozanın depolimerize olmasının daha hızlı gerçekleşmesi nedeniyle partikül boyunda küçülme olduğunu gözlemlemişlerdir (2011). Üç aylık ön stabilite incelemesi sonucunda kitozan mikropartikül formülasyonların zeta potansiyeli değerlerinde değişim görülmüş ve sıfırıncı ayda 9,16 ve 15,00 mV değerleri arasında olan zeta potansiyeli değerleri +4 ve + 25 °C sıcaklık koşullarında üç ayın sonunda 2 mV' un altına inmiştir. Üç aylık süreçte kitozan mikropartiküllerin zeta potansiyel değerlerinde meydana gelen bu azalmanın etkisiyle partiküller arasında agregasyonun meydana gelmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. +40 °C sıcaklık değerinde gerçekleştirilen zeta potansiyeli ölçümleri üç aylık süre sonunda kitozan mikropartiküllerin zeta potansiyeli değerlerinde artış meydana gelerek 35,1 ile 45,1 mV arasındaki değerler yükselmiştir. +40 °C' de zeta potansiyeli değerinde artışa neden olmasının kitozan yapısının bozulmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamız kapsamında hazırladığımız kitozan mikropartiküllerin ön stabilite değerlendirmesi sonucunda, mikropartikül formülasyonların +4 ve + 25 °C sıcaklık ve farklı bağıl nem koşullarında kitozan mikropartiküllerinde agregasyonun oluşarak partikül büyümesinin gerçekleştiği, +40 °C sıcaklık değerinde ise mikropartiküllerde polimer yapısında bozulmanın hızlanması sebebiyle partikül küçülmesinin meydana geldiği ve zeta potansiyel değerlerinde de üç aylık süreçte anlamlı farklılıkların meydana gelmesi sebebiyle hazırladığımız kitozan mikropartiküllerinin bu saklama koşulları altında stabilite problemi olduğu belirlenmiştir.

PLGA Mikropartiküller

PLGA mikropartikül formülasyonların ön stabilite incelemeleri +4, + 25 ve +40 °C olmak üzere üç farklı ortamda yapılmış ve formülasyonların stabilite değerlendirmesi partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyeli değeri parametrelerindeki değişiklikler göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Mikropartikül formülasyonlarının bu üç farklı ortamdaki partikül büyüklüğü değişimlerine bakıldığında; +4 buzdolabı ortamında hiçbir formülasyonun partikül boyutunda anlamlı bir değişiklik olmadığı ($p>0,05$), +25 °C % 60 bağıl nem koşulunda P8, P9, P11 ve P12 kodlu formülasyonlarının partikül büyümelerinde anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) ve 40 °C' de % 75 bağıl nem ortamında tüm formülasyonların partikül büyüklüğünde artışın olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Partikül büyüklüğü analizine ek olarak partikül büyüklük dağılımları incelendiğinde, partikül büyüklüğü değişimlerine paralel olarak partikül büyüklüğü dağılımının

genişliğini ifade eden SPAN değerlerinde +4 °C buzdolabı ortamında üç ay sonunda hiçbir formülasyonda değişiklik gözlenmemiştir ($p>0,05$). +25 °C sıcaklık değerinde ise formülasyonların SPAN değerlerinde artış gözlenmiştir ($p<0,05$) ancak P8, P9, P11 ve P12 kodlu mikropartikül formülasyonlarının SPAN değerlerinde değişiklik olmamıştır ($p>0,05$). +40 °C sıcaklık değerinde ise mikropartikül formülasyonların SPAN değerlerinde artış gerçekleşmiştir ($p<0,05$). PLGA bazlı partiküler sistemler üzerine yapılan stabilite çalışmaları incelendiğinde De ve Robinson' un yapmış oldukları çalışmada SEM incelemesi ile farklı ortam sıcaklıklarında altı gün süresince inceleme yapmışlar ve +4 °C' de nanopartiküllerin partikül büyüklüğünde bu süre zarfında içerisinde hiçbir değişimin olmadığını, +25 °C' de az miktarda agregasyonun gerçekleştiğini, +37 °C' de önemli derecede agregasyonun oluştuğunu ve +50 °C' de nanopartiküllerin eriyik hale geçtiğini belirtmişlerdir (2004). Lemonie ve arkadaşları ise PLGA' nın yapısının sıcaklık değişimlerine göre değişimini on iki ay süre ile incelemiş ve -16 ve +4 °C 'de polimer yapısının bozulmadığını ancak sıcaklık değerinin +25 °C' ye çıkarılmasıyla polimerde degradasyonun başladığını tespit etmişlerdir (1996). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç ve literatür incelemeleri değerlendirildiğinde +4 °C' de polimer yapısı ve mikropartikül büyüklüğünde bir değişim olmadığı söylenebilir. Sıcaklık değeri +25 °C' ye geldiğinde ise formülasyon bileşenine bağlı olarak agregasyonların başladığı görülmüştür. P8, P9, P11 ve P12 kodlu mikropartiküllerin bileşimine bakıldığında sürfaktan olarak % 1 ve % 1,5 oranlarında CTAB' ın kullanıldığı ve kullanılan sürfaktan maddeden kaynaklı olarak diğer formülasyonlara göre daha yüksek zeta potansiyeline (30,04-32,92 mV) sahip oldukları görülmektedir. Bu formülasyonların sahip oldukları yüksek zeta potansiyeli değerinin partikül agregasyonunu engellemeye katkısı olduğu düşünülmektedir. +40 °C sıcaklıkta ise hem polimer yapısında değişimin olabileceği hem de mikropartikül büyüklüklerinde artışın olduğu belirlenmiştir. Ön stabilite incelemelerinde zeta potansiyeli ölçümleri değerlendirildiğinde üç aylık süreç sonunda +4 °C' de formülasyonların zeta potansiyeli değerlerinde bir değişimin olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir. +25 °C sıcaklık koşulunda P1, P4, P6, P7 ve P10 kodlu formülasyonlarda zeta potansiyel değeri sıfırıncı ayda sırası ile -13,75 mV, -16,02 mV, -15,00 mV, 14,06 mV ve 12,84 mV şeklinde ölçülmüş iken üçüncü ay sonunda bu değerler azalarak -8,9 mV, -10,2 mV, -11,05 mV, 8,3 mV ve 7,3 mV şeklinde ölçülmüş ve zeta potansiyeli değerlerinde üç aylık süreç içerisinde önemli bir değişikliğin olduğu görülmüştür ($p<0,05$). +40 °C ortam koşulunda ise; tüm formülasyonların zeta potansiyeli değerlerinde düşüşün gerçekleştiği görülmüştür ($p<0,05$).

PLGA bazlı mikropartiküller üzerine farklı ortam koşullarında üç ay süre ile yapılan ön stabilite incelemesi sonucunda; PLGA mikropartiküllerinin partikül büyüklüğünün, partikül büyüklük dağılımının ve zeta potansiyeli değerlerinin değişmeden kalabileceği ortam koşulu +4 °C buzdolabı ortamı olarak belirlenmiş ve hazırlanan formülasyonların saklama koşulunun +4 °C olması gerektiği tespit edilmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında; osteoartrit tedavisinde oral yolla kullanılan bir NSAİİ olan tenoksikamın eklem içine uygulanmasını sağlayan ve burada kalma süresinin uzatılmasını hedefleyen formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu amaçla; tenoksikamın kitozan ve PLGA bazlı mikropartikülleri hazırlanmış ve geliştirilen bu mikropartikül formülasyonlarının eklem içerisinde sinovyal sıvıdan hızlıca uzaklaşmaması ve daha uzun süre burada kalabilmesi için kitozan termojel formülasyonu ile kombine edilerek mikropartikül/termojel kombinasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu formülasyonların geliştirilmesine ilişkin bulgular şu şekildedir:

- Kitozan bazlı mikropartikül formülasyonları iyonotropik jelasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde üretilmiş ve hedeflenen özelliklere sahip formülasyonların elde edilebilmesi amacıyla çözelti pH'sı, karıştırma hızı, TPP ve kitozan konsantrasyonu gibi parametrelerin üretim yöntemi ve mikropartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir.
- PLGA bazlı mikropartikül formülasyonları emülsifikasyon- solvent buharlaştırma yöntemi ile başarılı bir şekilde üretilmiş ve hedeflenen özelliklere sahip formülasyonların elde edilebilmesi için sürfaktan tipi ve konsantrasyonu ile polimer tipi ve konsantrasyonu gibi parametrelerin üretim yöntemi ve mikropartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir.
- Hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonları % 33,52-65,89 arasında bir verim ve % 42,14-78,54 arasında bir enkapsülasyon etkinliği sağlanarak üretilmiştir. Pozitif yüzey yüklü, 49,50-183,7 μm arasında partikül büyüklüğüne sahip formülasyonlar elde edilmiştir. Mikropartiküllerin bu özellikleri üzerine karıştırma hızının, çözelti pH'sının, TPP ve kitozan konsantrasyonunun etkili olduğu belirlenmiştir.
- Kitozan mikropartiküller ile eklem içi uygulamalar için hedeflenen partikül büyüklüğü aralığına ulaşılammış ve belirlenen üst limit (30 μm) aşılmıştır.
- Yapılan morfolojik incelemeler sonucunda düzensiz şekilli ve pürüzlü bir yüzeye sahip kitozan mikropartiküller elde edilmiştir.

- DSC ve FTIR analiz sonuçları değerlendirildiğinde formülasyondaki yardımcı maddeler ve etkin madde arasında bir etkileşim olmadığı belirlenmiştir.
- Kitozan mikropartiküllerden etkin madde salımı 24 saatte gerçekleşmiş ve saf etkin madde salım profili ile mukayese edildiğinde hedeflenen uzatılmış salım profili elde edilememiştir. Mikropartiküllerde etkin madde salım profili Hixson-Crowell kinetiğine uyum sağlamıştır.
- Farklı sıcaklık ve bağıl nemde yapılan ön stabilite çalışmalarında kitozan mikropartiküllerinin stabilite problemleri ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda stabilite çalışmalarına daha detaylı analizler yapılarak, sonuçların doğrulanması planlanmaktadır.
- Hazırlanan kitozan mikropartikül formülasyonları ile eklem içi uygulamalarda hedeflenen ideal partikül büyüklüğü, yüzey özellikleri ve uzatılmış salım profili gibi özellikler tam olarak sağlanamadığı için PLGA bazlı mikropartiküler sistemlerinin hazırlanmasına karar verilmiştir.
- Geliştirilen PLGA formülasyonları % 30-65 aralığındaki verim değerlerinde ve % 15-90 aralığındaki enkapsülasyon etkinliği ile üretilmiştir. Mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve verim üzerine karıştırma hızı, sürfaktan miktarı ve tipi ile PLGA miktarı ve tipi etkili olmuştur.
- PLGA mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan sürfaktan cinsine bağlı olarak mikropartiküllerin farklı yüzey özelliklerine sahip oldukları görülmüştür. Sürfaktan olarak PVA' nın kullanıldığı formülasyonların yüzey yükü negatif iken, CTAB'ın kullanıldığı formülasyonların yüzey yükü pozitif olarak elde edilmiştir. Yapılan pre-klinik çalışmalar pozitif yüklü mikropartiküler sistemlerin eklem içinde daha uzun süre kalabildiğini gösterdiği için CTAB ile hazırlanan mikropartiküllerin daha avantajlı olduğu düşünülmektedir.
- 9,27 ve 92,33 μm aralığında partikül büyüklüğüne sahip PLGA mikropartikül formülasyonları elde edilmiştir. Elde edilen mikropartiküllerin enjeksiyon sonrası eklem içerisinde inflamasyon oluşumuna neden olmayacak ve sinovisitler tarafından fagozite edilerek eklemden uzaklaştırılmayacak partikül büyüklük aralığında olduğu görülmüştür.
- Yapılan morfolojik incelemeler sonucunda küresel ve pürüzsüz bir yüzeye sahip PLGA mikropartikülleri elde edilmiştir.

- DSC ve FTIR analiz sonuçları değerlendirildiğinde formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler ve etkin madde arasında bir etkileşimin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca etkin maddenin PLGA matriks içerisinde amorf halde disperse olduğu tespit edilmiştir.
- PLGA mikropartiküllerinden etkin madde salım profilleri incelendiğinde sürfaktan olarak CTAB'ın kullanıldığı % 3 PLGA konsantrasyonu ile hazırlanan formülasyonlarda etkin madde salım profili 30 gün süre ile başarılı bir şekilde uzatılmıştır. Polimer matriksinden etkin madde salımının Higuchi kinetiği ile uyumlu olduğu görülmüş ve etkin madde salımında difüzyon mekanizmasının aktif rol aldığı belirlenmiştir.
- Farklı sıcaklıklarda ve bağıl nemde ön stabiliteleri değerlendirilen PLGA mikropartiküllerinin stabil kaldığı ve fizikokimyasal özelliklerinin değişmediği belirlenmiştir.
- Tüm yapılan incelemeler sonucunda elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmanın bir sonraki basamağında kullanılmak üzere CH3, P6, P8 ve P11 kodlu mikropartikül formülasyonları seçilmiştir.
- Çalışmanın ikinci aşamasında eklem bölgesinde mikropartiküllerin kalış süresini artırmak amacıyla kitozan termojel formülasyonları üretilmiştir. İdeal termojel formülasyonunun belirlenmesi amacıyla farklı molekül ağırlığında kitozan, ASP ve boraks kullanılmıştır.
- Yapılan viskozite incelemelerinde, termojel için en uygun kitozanın orta molekül ağırlıklı kitozan olduğu ve kitozanın presipitasyon gerçekleşmeden nötralleşmesine izin veren ajanın ise ASP olduğu belirlenmiştir.
- Yapılan DSC ve FTIR analizleri sonucunda mikropartikülformülasyonları ile termojelin karıştırılması sonucunda herhangi bir etkileşimin olmadığı görülmüştür.
- Hazırlanan termojel formülasyonlarının jelleşme süreleri ve enjekte edilebilirlikleri incelendiğinde T3 ve T4 formülasyonlarının uygun olduğu belirlenmiştir. Ancak yüksek konsantrasyonda ASP ile hazırlanan formülasyonda, kitozan ile ASP arasında gerçekleşen iyonik çekim kuvvetlerin daha kuvvetli olduğu düşünülmüş ve T4 kodlu termojel formülasyonu ön plana çıkmıştır.

- Yapılan morfolojik incelemeler sonucunda, termojel formülasyonlarının oldukça poroz bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. Formülasyonlarda kullanılan ASP konsantrasyonunun azalması ile porozite artmıştır. Termojel formülasyonlarının mikropartiküller ile karıştırılması sonucunda, termojellerin ve mikropartiküllerin fiziksel yapısı bozulmamıştır.

- T4 termojel formülasyonu ile seçilen mikropartikül formülasyonları karıştırılarak etkin madde çıkış profilleri incelendiğinde mikropartikül/termojel formülasyonlarından etkin madde salımının 30 gün süreyle devam etmiş ve en uzun salım profili P8 ve P11 kodlu formülasyonlarla elde edilmiştir. Sonuçlar saf etkin madde çözünme hızı ile mukayese edildiğinde salım uzamıştır. Yapılan in vitro testler sonucunda; mikropartiküllerin termojeller ile karıştırılmasının etkin madde salım hızı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ancak yapılması planlanan in vivo testler ile formülasyonların eklem içinde kalış süresinin test edilmesi planlanmaktadır.

- Osteoartrit tedavisinde; eklem içine uygulanarak kullanılması planlanan mikropartikül/termojel formülasyonlarının yapılan in vitro analizlerinin değerlendirilmesi sonucunda; P6 ve P8 mikropartikül formülasyonları ile kombine edilen T4 kodlu termojel formülasyonunun hedeflenen özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir. Mikropartiküllerin ve mikropartikül/termojel kombinasyonlarının in vitro analizleri sonucunda elde edilen bulguların desteklenmesi ve ön analizler sonucunda seçilen T4-P6 ve T4-P8 kodlu formülasyonlarının uygulanabilirliği ve etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla in vivo analizlerinin yapılması planlanmıştır.

ÖZET

Osteoartrit Tedavisinde İntraartiküler Uygulama İçin Mikropartikül / Termal Hidrojel Kombinasyon Sistemlerinin Hazırlanmasına Yönelik Çalışmalar

Osteoartrit tedavisinde NSAİİ'lerin uzun süreli oral kullanımları özellikle GIS üzerinde çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır. İstenmeyen bu etkileri azaltmak için NSAİİ'lerin doğrudan eklem içerisine enjeksiyonu ön plana çıkmıştır. Ancak NSAİİ'lerin eklem içerisine çözelti ya da süspansiyon şeklinde uygulanmaları durumunda etkin maddenin hızlıca eklem kavitesinden uzaklaştığı bilinmektedir. Çalışmamızda bu sorunu gidermek amacıyla; bir NSAİİ olan tenoksikamın enkapsüle edildiği mikropartikül/termojel kombinasyon sistemleri geliştirilerek, hazırlanan formülasyonların tenoksikamın eklem içerisinde salım süresini uzatması, mikropartiküllerin sinovyal sıvıda kalış süresini artırması ve enjeksiyon sonrasında partiküllerin neden olabileceği inflamasyona minimum seviyede neden olması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda mikropartikül formülasyonları kitozan ve PLGA polimerleri kullanılarak geliştirilmiştir. Kitozan mikropartikülleri hazırlanırken karıştırma hızı, çözelti pH' ısı, TPP ve kitozan konsantrasyonu gibi parametrelerin, PLGA mikropartikülleri hazırlanırken ise karıştırma hızı, sürfaktan madde cinsi ve konsantrasyonu ile PLGA tipi ve konsantrasyonu gibi parametrelerinin mikropartiküllerin üretimi ve fizikokimyasal özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaç ile; mikropartiküllerin üretim verimi, enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü ve dağılımı, fiziksel ve morfolojik özellikleri, termal analizi, etken madde çıkış hızı, salım kinetiği ve stabiliteleri incelenmiştir. Mikropartikül formülasyonları için yapılan bu incelemeler sonucunda, hedeflenen fizikokimyasal özelliklere sahip formülasyonlar belirlenmiş ve termojel formülasyonları ile kombinasyonlarının hazırlanması için seçilmiştir. Kitozan bazlı termojel formülasyonları hazırlanırken ise; kitozanın molekül ağırlığı ile zayıf bazik madde tipi ve konsantrasyonu parametrelerinin üretim ve termojel formülasyonlarının fizikokimyasal özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Formülasyon hazırlanmasında kullanılan çözeltilerin ve nihai formülasyonların viskozite, enjekte edilebilirlik ve jelleşme süresi tayinleri yapılarak üretim parametrelerinin etkisi değerlendirilmiştir. Eklem içerisine uygulamaya elverişli olan termojel formülasyonları belirlenerek önceden seçilmiş olan mikropartiküller ile karıştırılmıştır. Daha sonra ise; seçilen mikropartikül/termojel kombinasyon sistemlerinin fiziksel ve morfolojik incelemeleri, etkin madde çıkış hızı ve salım kinetiği çalışmaları yapılmıştır.

Mikropartikül/termojel sistemleri üzerine yapılan in vitro analizler sonucunda tenoksikamın salım süresi kitozan bazlı mikropartiküllerinde 24 saate kadar ve PLGA bazlı mikropartikül formülasyonlarında otuz güne kadar uzatılması başarı ile sağlanmıştır. Ayrıca mikropartikül/termojel kombinasyon formülasyonları eklem içerisinde enjekte edilebilecek uygun viskozlukta, 37 °C' de jelleşme süresi kısa ve oda sıcaklığında enjekte edilebilirliği mümkün şekilde başarı ile geliştirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: İntraartiküler enjeksiyon, Mikropartikül, PLGA, Tenoksikam, Termojel

SUMMARY

Development of microparticle/thermally responsive hydrogel combination systems for intraarticular administration in treatment of osteoarthritis

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are mainly preferred for osteoarthritis treatments even though long-term oral use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs can cause some undesirable adverse effects on GIS. Intra-articular administration of NSAIDs have been emerged in order to minimise these adverse effects. However, studies have shown that drugs can be easily removed from joint cavity upon administration of NSAIDs to joint as solution or suspension form. In order to address this issue, we have developed a novel tenoxicam encapsulated microparticle/thermogel combination formulation for providing sustained release of tenoxicam in joint cavity, long term localization of microparticles in synovium, and minimising occurring inflammation of post injection.

Chitosan and PLGA based microparticle formulations were developed. We investigated impact of some parameters like stirring rate, pH value of solutions, and concentration of chitosan and TPP on physicochemical properties of microparticles during the development process of chitosan microparticles. Similarly, we investigated effect of type of surfactant and polymer and concentration of surfactant and polymer on physicochemical properties of microparticles during the development process of PLGA microparticles. We then analysed yield of product, encapsulation efficiency, zeta potential, particle size and distribution, physical and morphological properties, drug release and release kinetics studies, and stability analysis. According to findings of the analyses, we selected the formulations that have optimal physicochemical properties for combination with thermogel formulations. Regarding to thermogel formulations, we examined the impact of process parameters such as chitosan molecular weight, type and concentration of weak bases on physicochemical properties of thermogel formulations. Additionally, some analysis procedures such as viscosity measurement of chitosan solutions and formulations, injectability evaluation, gelation time measurement have been applied to determine impact of process parameters. According to the results, we selected optimal thermogel formulation to combine preferred microparticle formulations. Afterwards, physical and morphological analysis, drug release and release kinetics studies were conducted to determine microparticle/thermogel combinations physicochemical properties.

The findings of our study suggests that chitosan microparticles provide prolong release up to 24 hours and PLGA microparticles provide sustained release up to 30 days. In addition, we accomplished to develop microparticle/thermogel formulations that are in favourable viscosity for injection into joint cavity, and have short gelation time and convenient injectability at room temperature.

Keywords: Intraarticular injection, Microparticles, PLGA, Tenoxicam, Thermogel

KAYNAKLAR

- AGNIHOTRI, S. A., MALLIKARJUNA, N. N., VE AMINABHAVI, T. M. (2004) Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release*, **100**(1):5–28.
- AKTAS, I., YALCIN, S., ve SENCER, S. (2010) Intra-articular injection of tenoxicam following temporomandibular joint arthrocentesis: a pilot study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, **39**(5):440–445.
- ALIMOHAMMADI, YOUNES HANIFEHPOUR AND JOO, SANG WOO. (2014) Plga-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**:517–535.
- ALLADI, S. ve SHASTRI, N. R. (2015) Semi solid matrix formulations of meloxicam and tenoxicam: an in vitro and in vivo evaluation. *Archives of pharmacal research*, **38**(5):801–812.
- ANTONIOU, J., LIU, F., MAJEED, H., QI, J., YOKOYAMA, W., ve ZHONG, F. (2015) Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **465**:137–146.
- ARDEN, N. VE NEVITT, M. C. (2006) Osteoarthritis: epidemiology. *Best practice & research Clinical RHEUMATOLOGY*, **20**(1):3–25.
- ARUNKUMAR, P., INDULEKHA, S., VIJAYALAKSHMI, S., VE SRIVASTAVA, R. (2016) Poly (caprolactone) microparticles and chitosan thermogels based injectable formulation of etoricoxib for the potential treatment of osteoarthritis. *Materials Science and Engineering: C*, **61**:534–544.
- AYDIN, R. ve PULAT, M. (2012) 5-fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for ph-stimulated drug delivery: evaluation of controlled release kinetics. *Journal of Nanomaterials*, **2012**:42.
- BAGRE, A. P., JAIN, K., ve JAIN, N. K. (2013) Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: in vitro and in vivo assessment. *International journal of pharmaceutics*, **456**(1):31–40.
- BANERJEE, R., CHAKRABORTY, H., VE SARKAR, M. (2003) Photophysical studies of oxycam group of nsaid: piroxicam, meloxicam and tenoxicam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **59**(6):1213–1222.
- BÉDOUET, L., MOINE, L., PASCALE, F., NGUYEN, V. N., LABARRE, D., ve LAURENT, A. (2014). Synthesis of hydrophilic intra-articular microspheres conjugated to ibuprofen and evaluation of anti-inflammatory activity on articular explants. *International journal of pharmaceutics*, **459**(1), 51-61.
- BERGINK, A., UITTERLINDEN, A., VAN LEEUWEN, J., HOFMAN, A., VERHAAR, J., VE POLS, H. (2005) Bone mineral density and vertebral fracture history are associated with incident and progressive radiographic knee osteoarthritis in elderly men and women: the rotterdam study. *Bone*, **37** (4):446–456.
- BERINGER, P ve TROY, B.D., (2006), *Remington: The science and practice of pharmacy*. Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

- BERRADA, M., SERREQI, A., DABBARH, F., OWUSU, A., GUPTA, A., VE LEHNERT, S. (2005) A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy. *Biomaterials*, **26**(14):2115–2120.
- BETRE, H., LIU, W., ZALUTSKY, M. R., CHILKOTI, A., KRAUS, V. B., VE SETTON, L. A. (2006) A thermally responsive biopolymer for intra-articular drug delivery. *Journal of controlled release*, **115** (2):175–182.
- BODMEIER, R., OH, K.-H., VE PRAMAR, Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug development and industrial pharmacy*, **15**(9):1475–1494, 1989.
- BRUYERE, O. VE REGINSTER, J.-Y. Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis. *Drugs & aging*, **24**(7):573–580, 2007.
- BRUYERE, O., PAVELKA, K., ROVATI, L. C., DEROISY, R., OLEJAROVA, M., GATTEROVA, J., GIACOVELLI, G., VE REGINSTER, J.-Y. (2004) Glucosamine sulfate reduces osteoarthritis progression in postmenopausal women with knee osteoarthritis: evidence from two 3-year studies. *Menopause*, **11**(2):138– 143.
- BUCKWALTER, J. A. VE LANE, N. E. (1997) Athletics and osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine*, **25**(6):873–881.
- BUDHIAN, A., SIEGEL, S. J., ve WINEY, K. I. (2008) Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded plga nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **346**(1): 151–159.
- BURT, H. M., TSALLAS, A., GILCHRIST, S., VE LIANG, L. S. (2009) Intra-articular drug delivery systems: overcoming the shortcomings of joint disease therapy. *Expert opinion on drug delivery*, **6** (1):17–26.
- BUTOESCU, N., JORDAN, O., VE DOELKER, E. (2009) Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: a review of the factors influencing their performance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **73**(2):205–218.
- CHAMPION, J. A., WALKER, A., ve MITRAGOTRI, S. (2008) Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharmaceutical research*, **25**(8):1815–1821.
- CHEN, A., GUPTE, C., AKHTAR, K., SMITH, P., VE COBB, (2012a) J. The global economic cost of osteoarthritis: how the uk compares. *Arthritis*, 2012.
- CHEN, F., SONG, S., WANG, H., ZHANG, W., LIN, C., MA, S., YE, T., ZHANG, L., YANG, X., QIN, X., ve ark. (2014a) Injectable chitosan thermogels for sustained and localized delivery of pingyangmycin in vascular malformations. *International journal of pharmaceutics*, **476**(1):232–240.
- CHEN, Z., LIU, D., WANG, J., WU, L., LI, W., CHEN, J., CAI, B.-C., VE CHENG, H. (2014b) Development of nanoparticles-in-microparticles system for improved local retention after intra-articular injection. *Drug delivery*, **21**(5):342–350.
- CHEN, Z.P., LIU, W., LIU, D., XIAO, Y.-Y., CHEN, H.-X., CHEN, J., LI, W., CAI, H., LI, W., CAI, B.-C., ve ark. (2012b) Development of brucine-loaded microsphere/thermally responsive hydrogel combination system for intra-articular administration. *Journal of controlled release*, **162**(3): 628–635.

- CHOU, T.C., FU, E., VE SHEN, E.-C. (2003) Chitosan inhibits prostaglandin e 2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated raw 264.7 macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, **308**(2):403–407.
- CHUNG, T.W., LIU, D.-Z., VE YANG, J.-S. Effects of interpenetration of thermo-sensitive gels by crosslinking of chitosan on nasal delivery of insulin: in vitro characterization and in vivo study. *Carbohydrate Polymers*, **82**(2):316–322.
- COGON, D., KELLINGRAY, S., INSKIP, H., CROFT, P., CAMPBELL, L., VE COOPER, C. (2010) Osteoarthritis of the hip and occupational lifting. *American journal of epidemiology*, **147**(6):523–528, 1998.
- COLBERT, S. T., CURRAN, E., O'HANLON, D. M., MORAN, R., ve MCCARROLL, M. (1999) Intra-articular tenoxicam improves postoperative analgesia in knee arthroscopy. *Canadian Journal of Anesthesia*, **46**(7):653–657,
- CONTRI, R. V., SOARES, R. M., POHLMANN, A. R., ve GUTERRES, S. S. (2014) Structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*, **42**: 234–242.
- COOK, T., TUCKEY, J., ve NOLAN, J. (1997) Analgesia after day-case knee arthroscopy: double-blind study of intra-articular tenoxicam, intra-articular bupivacaine and placebo. *British journal of anaesthesia*, **78**(2):163–168.
- DANHIER, F., ANSORENA, E., SILVA, J. M., COCO, R., LEBRETON, A., VEPRE'AT, V. Plga-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*, **161**(2):505–522, 2012.
- DASH, S., MURTHY, P. N., NATH, L., ve CHOWDHURY, P. (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, **67**(3):217–23.
- DAY, R., WILLIAMS, K., GRAHAM, S., VE HANDEL, M. (1991) The pharmacokinetics of total and unbound concentrations of tenoxicam in synovial fluid and plasma. *Arthritis & Rheumatism*, **34**(6): 751–760.
- DE, S. ve ROBINSON, D. H. (2004) Particle size and temperature effect on the physical stability of plga nanospheres and microspheres containing bodipy. *Aaps Pharmscitech*, **5**(4):18–24.
- DOOLAANE, A. A., ISMAIL, A. F. H., NOR, N. H. M., MOHAMED, F., ve ark. (2015) Effect of surfactants on plasmid dna stability and release from poly (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **14**(10):1769–1778.
- DUDHANI, A. R. ve KOSARAJU, S. L. (2010) Bioadhesive chitosan nanoparticles: preparation and characterization. *Carbohydrate polymers*, **81**(2):243–251.
- DUTTA, P. K., DUTTA, J., VE TRIPATHI, V. (2004) Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of scientific and industrial research*, **63**(1):20–31.
- EDWARDS, S. H. (2011) Intra-articular drug delivery: the challenge to extend drug residence time within the joint. *The Veterinary Journal*, **190**(1):15–21.
- EL-GAZAYERLY, O. N. (2000) Characterization and evaluation of tenoxicam coprecipitates. *Drug development and industrial pharmacy*, **26**(9):925–930.

- ELWERFALLI, A. M., AL-KINANI, A., ALANY, R. G., ve ELSHAER, (2015) A. Nano-engineering chitosan particles to sustain the release of promethazine from orodispersables. *Carbohydrate polymers*, **131**:447–461.
- EVCİK, D., KIZILAY, B., VE MARALCAN, G. (2001) Diz osteoartrit tedavisinde intraartiküler tenoksikamin etkinliği. *Turkish Journal of Rheumatology*, **16**:22-26.
- FALCO, N., REVERCHON, E., ve DELLA PORTA, (2013) G. Injectable plga/hydrocortisone formulation produced by continuous supercritical emulsion extraction. *International journal of pharmaceutics*, **441**(1):589–597.
- FAY, F., QUINN, D. J., GILMORE, B. F., MCCARRON, P. A., VE SCOTT, C. J. (2010) Gene delivery using dimethyldidodecylammonium bromide-coated plga nanoparticles. *Biomaterials*, **31**(14): 4214–4222.
- FELSON, D. VE LAWRENCE, R. (2000) Nih conference osteoarthritis: new insights. *Annals of Internal Medicine, Philadelphia*, **133**(8):637–639.
- FREI, B. (1994) Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*, **97**(3):S5–S13.
- GAN, Q. ve WANG, T. (2007) Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **59**(1):24–34.
- GAN, Q., WANG, T., COCHRANE, C., ve MCCARRON, P. (2005) Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–tpp nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **44**(2):65–73.
- GANJI, F. ve ABDEKHODAIE, M. J. (2010) Chitosan–g-plga copolymer as a thermosensitive membrane. *Carbohydrate Polymers*, **80**(3):740–746.
- GERWIN, N., HOPS, C., VE LUCKE, A. (2006) Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Advanced drug delivery reviews*, **58**(2):226–242.
- GIROTRA, P., SINGH, S. K., ve KUMAR, G. (2016) Development of zolmitriptan loaded plga/poloxamer nanoparticles for migraine using quality by design approach. *International journal of biological macromolecules*, **85**:92–101.
- GOODFRIEND, A. C., WELCH, T. R., NGUYEN, K. T., JOHNSON, R. F., SEBASTIAN, V., REDDY, S. V., FORBESS, J., ve NUGENT, A. (2016) Thermally processed polymeric microparticles for year-long delivery of dexamethasone. *Materials Science and Engineering: C*, **58**:595–600.
- GOVINDASAMY, G., KRISHNAMOORTHY, K., ve RAJAPPAN, M. (2013) Selection of excipients for nanoparticles formulations of nateglinide through drug excipients compatibility study. *Int J Pharm PharmSci*, **5**(2):371–7.
- Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, I.
- GUINESI, L. S. ve CAVALHEIRO, E. T. G. (2006) The use of dsc curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta*, **444**(2):128–133.

- GUPTA, P. N., JAIN, S., NEHATE, C., ALAM, N., KHARE, V., DUBEY, R. D., SANEJA, A., KOUR, S., ve SINGH, S. K. (2014) Development and evaluation of paclitaxel loaded plga: poloxamer blend nanoparticles for cancer chemotherapy. *International journal of biological macromolecules*, **69**:393–399.
- HAMIDI, M., AZADI, A., VE RAFIEI, P. (2008) Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, **60**(15):1638–1649.
- HART, D. J., DOYLE, D. V., VE SPECTOR, T. (1999) Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women. *Arthritis Rheum*, **42**(1):17–24.
- HART, D. J., CRONIN, C., DANIELS, M., WORTHY, T., DOYLE, D. V., ve SPECTOR, T. D. (2002) The relationship of bone density and fracture to incident and progressive radiographic osteoarthritis of the knee: the chingford study. *Arthritis & Rheumatism*, **46**(1):92–9.
- HASSANI, S., LAOUINI, A., FESSI, H., ve CHARCOSSET, C. (2015) Preparation of chitosan–tpp nanoparticles using microengineered membranes—effect of parameters and encapsulation of tacrine. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **482**:34–43.
- HINES, D. J. ve KAPLAN, D. L. (2013) Poly (lactic-co-glycolic) acid- controlled-release systems: experimental and modeling insights. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **30**(3).
- HIROTA, K., HASEGAWA, T., HINATA, H., ITO, F., INAGAWA, H., KOCHI, C., SOMA, G.-I., MAKINO, K., ve TERADA, H. (2007) Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded plga microspheres by alveolar macrophages. *Journal of controlled release*, **119**(1):69–76.
- HORISAWA, E., HIROTA, T., KAWAZOE, S., YAMADA, J., YAMAMOTO, H., TAKEUCHI, H., VE KAWASHIMA, Y. Prolonged anti-inflammatory action of dl-lactide/glycolide copolymer nanospheres containing betamethasone sodium phosphate for an intra-articular delivery system in antigen- induced arthritic rabbit. *Pharmaceutical research*, **19**(4):403–410.
- HORISAWA, E., KUBOTA, K., TUBOI, I., SATO, K., YAMAMOTO, H., TAKEUCHI, H., VE KAWASHIMA, Y. (2002a) Size-dependency of dl-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharmaceutical research*, **19**(2):132–139, 2002b.
- HOU, D., GUI, R., HU, S., HUANG, Y., FENG, Z., PING, Q., ve ark. (2015) Preparation and characterization of novel drug-inserted-montmorillonite chitosan carriers for ocular drug delivery. *Advances in Nanoparticles*, **4**(03):70.
- HUANG, H., ZHANG, X., HU, X., SHAO, Z., ZHU, J., DAI, L., MAN, Z., YUAN, L., CHEN, H., ZHOU, C., ve ark. (2014) A functional biphasic biomaterial homing mesenchymal stem cells for in vivo cartilage regeneration. *Biomaterials*, **35**(36):9608–9619.
- ILIUM, L. (1998) Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*, **15**(9): 1326–1331.
- ISMAIL, H., FAHMI, A., DOOLAANEA, A. M., AWANG, M., ve MOHAMED, F. (2012) High initial burst release of gentamicin formulated as plga microspheres implant for treating orthopaedic infection. *Int J Pharm Pharmaceut Sci*, **4**:685–91.

- JAIN, A., THAKUR, K., SHARMA, G., KUSH, P., ve JAIN, U. K. (2016) Fabrication, characterization and cytotoxicity studies of ionically cross-linked docetaxel loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, **137**:65–74.
- JAIN, J. P. ve KUMAR, N. (2010) Development of amphotericin b loaded polymersomes based on (peg) 3-pla co-polymers: factors affecting size and in vitro evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **40**(5):456–465.
- JAWISH, R., NAJDI, H., SAFI, C. A., ve CHAMESEDDINE, A. (2015) The effect of intra-articular tenoxicam on knee effusion after arthroscopy. *International orthopaedics*, **39**(7):1423–1426.
- JEON, H.-J., JEONG, Y.-I., JANG, M.-K., PARK, Y.-H., ve NAH, J.-W. (2000) Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly (dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. *International journal of pharmaceutics*, **207**(1):99–108.
- JIANG, Y. VE TUAN, R. S. (2015) Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, **11**(4):206–212.
- JONSSON, H., MANOLESCU, I., STEFANSSON, S. E., INGVARSSON, T., JONSSON, H. H., MANOLESCU, A., GULCHER, J., VE STEFANSSON, K. (2003) The inheritance of hand osteoarthritis in iceland. *Arthritis & Rheumatism*, **48**(2):391–395.
- KALAN, T. (2010) *Diz artroskopilerinden sonar İntravenöz olarak uygulanan lornoksikam ile İntravenöz olarak uygulanan tenoksikamın postoperatif analjezik etkinliklerinin karşılaştırılması*, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi.
- KALOTI, M. ve BOHIDAR, H. (2010) Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **81**(1): 165–173.
- KANG, M. L., KO, J.-Y., KIM, J. E., VE IM, G.-I. (2014) Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/microparticles for cartilage regeneration. *Biomaterials*, **35**(37):9984–9994.
- KAPRIO, J., KUJALA, U. M., PELTONEN, L., VE KOSKENVUO, M. (1996) Genetic liability to osteoarthritis may be greater in women than men. *BMJ: British Medical Journal*, **313**(7051):232.
- KATİYAR, S., PANDIT, J., MONDAL, R. S., MISHRA, A. K., CHUTTANI, K., AQIL, M., ALI, A., ve SULTANA, Y. (2014) In situ gelling dorzolamide loaded chitosan nanoparticles for the treatment of glaucoma. *Carbohydrate polymers*, **102**:117–124.
- KAWADKAR, J. ve CHAUHAN, M. K. (2012) Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **81**(3):563–572.
- KAWADKAR, J., JAIN, R., KISHORE, R., PATHAK, A., ve CHAUHAN, M. K. (2013). Formulation and evaluation of flurbiprofen-loaded genipin cross-linked gelatin microspheres for intra-articular delivery. *Journal of drug targeting*, **21**(2), 200-210.
- KAYAALP, S. O. (2005) *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*. Hacettepe Taş Kitapçılık Limited ŞTİ.

- KITTUR, F., PRASHANTH, K. H., SANKAR, K. U., ve THARANATHAN, R. (2002) Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate polymers*, **49**(2):185–193.
- KO, J.-Y., CHOI, Y.-J., JEONG, G.-J., ve IM, G.-I. (2013) Sulforaphane–plga microspheres for the intra- articular treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, **34**(21):5359–5368.
- KONECSNI, K., LOW, N., ve NICKERSON, M. (2012) Chitosan–tripolyphosphate submicron particles as the carrier of entrapped rutin. *Food chemistry*, **134**(4):1775–1779.
- KOUCHAK, M., AZARPANAH, A., ve ark. (2015) Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing diclofenac using the ion-gelation method. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, **10**(2).
- KRISHNAMACHARI, Y., MADAN, P., VE LIN, S. (2007) Development of ph-and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon. *International journal of pharmaceutics*, **338**(1):238–247.
- KIM, S. R., HO, M. J., LEE, E., LEE, J. W., CHOI, Y. W., VE KANG, M. J. (2015) Cationic plga/eudragit rl nanoparticles for increasing retention time in synovial cavity after intra-articular injection in knee joint. *International journal of nanomedicine*, **10**:5263.
- KUJALA, U. M., KETTUNEN, J., PAANANEN, H., AALTO, T., BATTIE, M. C., IMPIVAARA, O., VIDEMAN, T., ve SARNA, S. (1995) Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters. *Arthritis & Rheumatism*, **38**(4):539–546.
- KUMAR, M. N. R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, **46**(1):1–27.
- KUMAR, M. R., MUZZARELLI, R., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H., VE DOMB, A. (2004) Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, **104**(12):6017–6084.
- KUMAR, L., VERMA, S., JAMWAL, S., VAIDYA, S., ve VAIDYA, B. (2014). Polymeric microparticles-based formulation for the eradication of cutaneous candidiasis: development and characterization. *Pharmaceutical development and technology*, **19**(3), 318-325.
- LANE, N. E., GORE, L. R., CUMMINGS, S. R., HOCHBERG, M. C., SCOTT, J. C., WILLIAMS, E. N., ve NEVITT, M. C. (1999) Serum vitamin d levels and incident changes of radiographic hip osteoarthritis: a longitudinal study. *Arthritis & Rheumatism*, **42**(5):854–860.
- LANYON, P., MUIR, K., DOHERTY, S., VE DOHERTY, M. (2000) Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study. *Bmj*, **321**(7270):1179–1183.
- LAVERTU, M., FILION, D., VE BUSCHMANN, M. D. (2008) Heat-induced transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate produces chitosan precipitation and gelation. *Biomacromolecules*, **9** (2):640–650.
- LE BROCK-RYCKEWAERT, D., CARPENTIER, R., LIPKA, E., DAHER, S., VACCHER, C., BETBEDER, D., ve FURMAN, C. (2013) Development of innovative paclitaxel-loaded small plga nanoparticles: study of their antiproliferative activity and their molecular interactions on prostatic cancer cells. *International journal of pharmaceutics*, **454**(2):712–719.
- LEE, C. H., MOTURI, V., ve LEE, Y. (2009). Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *Journal of Controlled Release*, **136**(2), 88-98.

- LEMOINE, D., FRANCOIS, C., KEDZIEREWICZ, F., PREAT, V., HOFFMAN, M., ve MAINCENT, P. (1996) Stability study of nanoparticles of poly caprolactone, poly (d, l-lactide) and poly (d, l-lactide-co- glycolide). *Biomaterials*, **17**(22):2191–2197.
- LIANG, L. S., JACKSON, J., MIN, W., RISOVIC, V., WASAN, K. M., VE BURT, H. M. (2004) Methotrexate loaded poly (l-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexate to the joint. *Journal of pharmaceutical sciences*, **93**(4):943–956.
- LIGGINS, R., CRUZ, T., MIN, W., LIANG, L., HUNTER, W., VE BURT, H. (2004) Intra-articular treatment of arthritis with microsphere formulations of paclitaxel: biocompatibility and efficacy determinations in rabbits. *Inflammation Research*, **53**(8):363–372.
- LIU, H. ve GAO, C. (2009) Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. *Polymers for Advanced Technologies*, **20**(7):613–619.
- LUO, Y., ZHANG, B., CHENG, W.-H., ve WANG, Q. (2010) Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/tpp nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydrate Polymers*, **82**(3):942–951.
- MAHMOUD, S. S., HASSAN, M. A., EL-KHATIB, F. H., OBAIDAT, A. A., ve SHEIKH-SALEM, M. (2000) The kinetics of tenoxicam photodegradation in solution. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, **70**(1):119–124.
- MARTINS, A. F., DE OLIVEIRA, D. M., PEREIRA, A. G., RUBIRA, A. F., ve MUNIZ, E. C. (2012) Chitosan/tpp microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. *International journal of biological macromolecules*, **51**(5):1127–1133.
- MASON, J. L. ve HOBBS, G. J. (1995) Simple method for the analysis of tenoxicam in human plasma using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **665**(2):410–415.
- MATHERS, C., FAT, D. M., ve BOERMA, J. T. (2008) *The global burden of disease: 2004 update*. World Health Organization.
- MCALINDON, T. E., FELSON, D. T., ZHANG, Y., HANNAN, M. T., ALIABADI, P., WEISSMAN, B., RUSH, D., WILSON, P. W., ve JACQUES, P. (1996) Relation of dietary intake and serum levels of vitamin d to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the framingham study. *Annals of internal medicine*, **125**(5):353–359.
- MCLAUGHLIN, S. W., CUI, Z., STARNES, T., LAURENCIN, C. T., KAN, H.-M., WU, Q., ve NAIR, L. S. (2012) Injectable thermogelling chitosan for the local delivery of bone morphogenetic protein. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **23**(9):2141–2149.
- MONETTE, A., CECCALDI, C., ASSAAD, E., LEROUGE, S., ve LAPOINTE, R. (2016) Chitosan thermogels for local expansion and delivery of tumor-specific t lymphocytes towards enhanced cancer immunotherapies. *Biomaterials*, **75**:237–249.
- MORRIS, G. A., CASTILE, J., SMITH, A., ADAMS, G. G., ve HARDING, S. E. (2011) The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (tpp)– chitosan nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, **84**(4):1430–1434.
- MOYA-HERNÁNDEZ, M., MEDEROS, A., DOMÍNGUEZ, S., ORLANDINI, A., GHILARDI, C., CECCONI, F., GONZÁLEZ-VERGARA, E., ve ROJAS-HERNÁNDEZ, A. (2003) Speciation study of the anti-inflammatory drug tenoxicam (htenox) with cu (ii): X-ray crystal structure of [cu (tenox) 2 (py) 2]· etoh. *Journal of inorganic biochemistry*, **95**(2):131–140.

- NAHATA, T. ve SAINI, T. (2008) Optimization of formulation variables for the development of long acting microsphere based depot injection of olanzapine. *Journal of microencapsulation*, **25**(6):426–433.
- NAIR, L. S., STARNES, T., KO, J.-W. K., ve LAURENCIN, C. T. (2007) Development of injectable thermogelling chitosan–inorganic phosphate solutions for biomedical applications. *Biomacromolecules*, **8**(12):3779–3785.
- NEGI, L. M., CHAUHAN, M., ve GARG, A. K. (2013) Nano-appended transdermal gel of tenoxicam via ultradeformable drug carrier system. *Journal of Experimental Nanoscience*, **8**(5):657–669.
- NESSEEM, D. I., EID, S., ve EL-HOUSENY, S. (2011) Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. *Life sciences*, **89**(13):430–438.
- NEUSTADT, D. H. (2006) Intra-articular injections for osteoarthritis of the knee. *Cleveland Clinic journal of medicine*, **73**(10):897.
- NEVITT, M., CUMMINGS, S., LANE, N., GENANT, H., PRESSMAN, A., ve HOCHBERG, M. (1994) Current use of oral estrogen is associated with a decreased prevalence of radiographic hip oa in elderly white women. *Arthritis Rheum*, **37**(9):S212.
- NEVITT, M. C., LANE, N. E., SCOTT, J. C., HOCHBERG, M. C., PRESSMAN, A. R., GENANT, H. K., ve CUMMINGS, S. R. (1995) Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. *Arthritis & Rheumatism*, **38**(7):907–916.
- NEWTON, P. M., MOW, V. C., GARDNER, T. R., BUCKWALTER, J. A., ve ALBRIGHT, J. P. (1997) The effect of lifelong exercise on canine articular cartilage. *The American journal of sports medicine*, **25** (3):282–287.
- NISHIDE, M., KAMEI, S., TAKAKURA, Y., TAMAI, S., TABATA, Y., ve IKADA, Y. Fate of biodegradable dl-lactic acid oligomer microspheres in the articular. *Journal of bioactive and compatible polymers*, **14**(5):385–398, 1999.
- OZYUVACI, H., BILGIC, B., OZYUVACI, E., ALTAN, A., ALTUG, T., ve KARACA, C. (2004) Intra-articular injection of tenoxicam in rats: assessment of the local effects on the articular cartilage and synovium. *Journal of international medical research*, **32**(3):312–316.
- PAN, Z. VE DING, J. (2012) Poly (lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface focus*, **2**(3):366–377.
- PAPATHANASSIOU, N. (1994) Intra-articular use of tenoxicam in degenerative osteoarthritis of the knee joint. *Journal of international medical research*, **22**(6):332–337.
- PETIT, A. (2014) In situ forming hydrogels for intra-articular delivery of celecoxib: from polymer design to in vivo studies. *Utrecht University Repository*
- PRADAL, J., JORDAN, O., ve ALLE'MANN, (2012) E. Intra-articular drug delivery for arthritis diseases: the value of extended release and targeting strategies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **22**(5):409–419.
- PRADHAN, R., RAMASAMY, T., CHOI, J. Y., KIM, J. H., POUDEL, B. K., TAK, J. W., NUKOLOVA, N., CHOI, H.-G., YONG, C. S., ve KIM, J. O. (2015) Hyaluronic acid-decorated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for combined delivery of docetaxel and tanespimycin. *Carbohydrate polymers*, **123**:313–323.

- PUEBLA, P., PASTORIZA, P., BARCIA, E., VEFERNA'NDEZ-CARBALLIDO, A. (2005) Peg-derivativeeffectively modifies the characteristics of indomethacin-plga microspheres destined to intra-articular administration. *Journal of microencapsulation*, **22**(7):793–808,.
- PUIG-JUNOY, J. ve ZAMORA, A. R. (2015) Socio-economic costs of osteoarthritis: A systematic review of cost-of-illness studies. In *Seminars in arthritis and rheumatism*, volume **44**, pages 531–541. Elsevier2015.
- QIU, G. X., GAO, S. N., GIACOVELLI, G., ROVATI, L., ve SETNIKAR, I. (1998) Efficacy and safety of glucosamine sulfate versus ibuprofen in patients with knee osteoarthritis. *Arzneimittel-Forschung*, **48**(5):469–474.
- RAM'IREZ-SILVA, M., GUZMA'N-HERNA'NDEZ, D., GALANO, A., ROJAS-HERNA'NDEZ, A., CORONA- AVENDAN'O, S., ROMERO-ROMO, M., ve PALOMAR-PARDAVE', M. Spectro-electrochemical and dft study of tenoxicam metabolites formed by electrochemical oxidation. *Electrochimica Acta*, **111**:314–323, 2013.
- RAO, N. R., KULKARNI, U., DESHMUKH, A., ve SURESH, D. (2010) Preparation and characterization of ionotropic cross-linked chitosan microparticles for controlled release of aceclofenac. *Int J Pharm Sci Drug Res*, **2**(2):107–111.
- RAO, P. ve KNAUS, E. E. (2008) Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (nsaids): cyclooxygenase (cox) inhibition and beyond. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, **11**(2):81–110s.
- RATCLIFFE, J., HUNNEYBALL, I., SMITH, A., WILSON, C., ve DAVIS, S. (1984) Preparation and evaluation of biodegradable polymeric systems for the intra-articular delivery of drugs. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **36**(7):431–436.
- REN, D., YI, H., WANG, W., ve MA, X. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of n-acetylation. *Carbohydrate Research*, **340**(15): 2403–2410, 2005.
- RIANCHO, J., GARC'IA-IBARBIA, C., GRAVANI, A., RAINE, E. V., RODR'IGUEZ-FONTENLA, C., SOTO- HERMIDA, A., REGO-PEREZ, I., DODD, A. W., GO'MEZ-REINO, J. J., ZARRABEITIA, M., ve ark. (2010) Common variations in estrogen-related genes are associated with severe large-joint osteoarthritis: a multicenter genetic and functional study. *Osteoarthritis and Cartilage*, **18** (7):927–933.
- RICHY, F., BRUYE'RE, O., ETHGEN, O., RABENDA, V., BOUVENOT, G., AUDRAN, M., HERRERO-BEAUMONT, G., MOORE, A., ELIAKIM, R., HAIM, M., ve ark. (2004) Time dependent risk of gastrointestinal complications induced by non-steroidal anti-inflammatory drug use: a consensus statement using a meta-analytic approach. *Annals of the rheumatic diseases*, **63**(7):759–766.
- RINAUDO, M. (2006) Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, **31** (7):603–632.
- RUEL-GARIEPY, E. ve LEROUX, J.-C. (2004) In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **58**(2):409–426.
- RUEL-GARIE'PY, E., SHIVE, M., BICHARA, A., BERRADA, M., LE GARREC, D., CHENITE, A., ve LEROUX, J.- C. (2004) A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**(1):53–63.

- SALOPEK, B., KRASIC', D., ve FILIPOVIC', S. (1992) *Measurement and application of zeta-potential*. Rudarsko-geolos'ko-naftni fakultet.
- SANDMARK, H., HOGSTEDT, C., LEWOLD, S., ve VINGARD, E. (1999) Osteoarthritis of the knee in men and women in association with overweight, smoking, and hormone therapy. *Annals of the rheumatic diseases*, **58**(3):151–155.
- SANNAN, T., KURITA, K., ve IWAKURA, Y. (1976) Studies on chitin, 2. effect of deacetylation on solubility. *Die Makromolekulare Chemie*, **177**(12):3589–3600.
- SANTANA, M., DA SILVA, C., ve MARTINS, F. (2008) Mucoadhesive granules containing chitosan nano- and/or microspheres and process for obtaining said mucoadhesive granules. Technical report, PCT/BR2008/000123 (Ed.).
- SARAVANAN, M., ANBU, J., MAHARAJAN, G., ve PILLAI, K. S. (2008) Targeted delivery of diclofenac sodium via gelatin magnetic microspheres formulated for intra-arterial administration. *Journal of drug targeting*, **16**(5):366–378.
- SARMENTO, B., FERREIRA, D., VEIGA, F., ve RIBEIRO, A. (2006) Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through dsc and ftir studies. *Carbohydrate Polymers*, **66**(1):1–7.
- SCHUETZ, Y. B., GURNY, R., ve JORDAN, O. A novel thermoresponsive hydrogel based on chitosan. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68**(1):19–25, 2008.
- SHAIKH, J., ANKOLA, D., BENIWAL, V., SINGH, D., ve KUMAR, M. R. (2009) Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **37**(3):223–230.
- SIPOLI, C. C., SANTANA, N., SHIMOJO, A. A. M., AZZONI, A., ve DE LA TORRE, L. G. (2015) Scalable production of highly concentrated chitosan/tpp nanoparticles in different phs and evaluation of the in vitro transfection efficiency. *Biochemical Engineering Journal*, **94**:65–73.
- SONAJE, K., ITALIA, J., SHARMA, G., BHARDWAJ, V., TIKOO, K., ve KUMAR, M. R. (2007) Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine a-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmaceutical research*, **24**(5):899–908.
- SONG, X., ZHAO, Y., WU, W., BI, Y., CAI, Z., CHEN, Q., LI, Y., ve HOU, S. (2008) Plga nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *International journal of pharmaceutics*, **350** (1):320–329.
- SOWERS, M. R., MCCONNELL, D., JANNAUSCH, M., BUYUKTUR, A. G., HOCHBERG, M., ve JAMADAR, D. A. (2006) Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, **54**(8):2481–2487.
- SPECTOR, T. D. ve MACGREGOR, A. J. (2004) Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis and cartilage*, **12**:39–44.
- SUGITA, P., AMBARSARI, L., SARI, Y., ve NUGRAHA, Y. (2013) Ketoprofen encapsulation optimization with chitosan-alginate cross-linked with sodium tripolyphosphate and its release mechanism determination using in vitro dissolution. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, **14**(1):141–149.

- SUN, G., ZHANG, X.-Z., ve CHU, C.-C. (2007) Formulation and characterization of chitosan-based hydrogel films having both temperature and pH sensitivity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **18**(8):1563–1577.
- SUPPER, S., ANTON, N., SEIDEL, N., RIEMENSCHNITTER, M., SCHOCH, C., ve VANDAMME, T. (2013) Rheological study of chitosan/polyol-phosphate systems: Influence of the polyol part on the thermo-induced gelation mechanism. *Langmuir*, **29**(32):10229–10237.
- SWEETMAN, SC. (2009) Martindale The Complete Drug Reference 36th, Pharmaceutical Press, 128
- ŞENGEL-TÜRK, C.T., HASÇIÇEK, C., DOĞAN, A.L., ESENDAGLI, G., GÜC, D., ve GÖNÜL, N. (2012) Preparation and in vitro evaluation of meloxicam-loaded PLGA nanoparticles on HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Drug development and industrial pharmacy*, **38**(9):1107–1116.
- THAKKAR, H., SHARMA, R., MISHRA, A., CHUTTANI, K., ve MURTHY, R. (2004) Celecoxib incorporated chitosan microspheres: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of drug targeting*, **12**(9-10): 549–557.
- THAKKAR, H., SHARMA, R. K., ve MURTHY, R. (2007) Enhanced retention of celecoxib-loaded solid lipid nanoparticles after intra-articular administration. *Drugs in R & D*, **8**(5):275–285.
- THING, M., LU, Y., ÅGÅRDH, L., LARSEN, C., ØSTERGAARD, J., HE, W., ve LARSEN, S. W. (2013). Prolonged naproxen joint residence time after intra-articular injection of lipophilic solutions comprising a naproxen glycolamide ester prodrug in the rat. *International journal of pharmaceutics*, **451**(1), 34-40.
- TURK, C. T. S., OZ, U. C., SERİM, T. M., ve HASÇIÇEK, C. (2014) Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide-loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments. *AAPS PharmSciTech*, **15**(1):161–176.
- ÜNÜVAR, N., MOLLAHALİLOĞLU, S., YARDIM, N. (2006). Türkiye hastalık yükü çalışması 2004. *TC Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü. 1. Basım. Ankara: Aydoğdu Ofset Matbaacılık San. ve Tic. Ltd. Şti*, 1-56.
- ÜSTÜNES, L. (Producer). (2016). Rxmediapharma®
- VANDERVOORT, J., DILLEN, K., VAN DEN MOOTER, G., VERHEYDEN, L., ve LUDWIG, A. (2004). Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, **275**(1), 171-187.
- VIGNON, E., MATHIEU, P., LOUISOT, P., ve RICHARD, M. (1991). In vitro effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on proteoglycanase and collagenase activity in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, **34**(10), 1332-1335.
- WEI, Z., WANG, C., LIU, H., ZOU, S., ve TONG, Z. (2012) Facile fabrication of biocompatible PLGA drug-carrying microspheres by o/w pickering emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **91**:97–105.
- WICHTERLE, O. ve LIM, D. (1960) Hydrophilic gels for biological use. *Nature* **185**, 117 - 118
- WILLIAMS, C. S., MANN, M., ve DUBOIS, R. N. (1999) The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, **18**(55).

- WISCHKE, C. ve SCHWENDEMAN, S. P. (2008) Principles of encapsulating hydrophobic drugs in pla/plga microparticles. *International Journal of pharmaceutics*, **364**(2):298–327.
- WRIGHT, G., HUGHES, A., REGAN, M., ve DOHERTY, M. (1996) Association of two loci on chromosome 2q with nodal osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, **55**(5):317–319.
- WU, Y., YANG, W., WANG, C., HU, J., ve FU, S. (2005) Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International journal of pharmaceutics*, **295**(1):235–245.
- XIA, W., LIU, P., ZHANG, J., ve CHEN, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, **25**(2):170–179, 2011.
- YANG, C.-H., LIN, Y.-S., HUANG, K.-S., HUANG, Y.-C., WANG, E.-C., JHONG, J.-Y., ve KUO, C.- Y. (2009) Microfluidic emulsification and sorting assisted preparation of monodisperse chitosan microparticles. *Lab Chip*, **9**(1):145–150.
- YOKSAN, R., JIRAWUTTHIWONGCHAI, J., ve ARPO, K. (2010) Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **76**(1):292–297.
- ZAKI, S. S. O., KATAS, H., ve HAMID, Z. A. (2015) Lineage-related and particle size-dependent cytotoxicity of chitosan nanoparticles on mouse bone marrow-derived hematopoietic stem and progenitor cells. *Food and Chemical Toxicology*, **85**:31–44.
- ZAYED, M., EL-DIEN, F. N., MOHAMED, G. G., ve EL-GAMEL, N. E. (2007) Ftir, magnetic, mass spectral, xrd and thermal studies of metal chelates of tenoxicam. *Journal of Molecular Structure*, **841** (1):41–50.
- ZHANG, H. ve GAO, S. (2007) Temozolomide/plga microparticles and antitumor activity against glioma c6 cancer cells in vitro. *International journal of pharmaceutics*, **329**(1):122–128.
- ZHANG, Y., MCALINDON, T. E., HANNAN, M. T., CHAISSON, C. E., KLEIN, R., WILSON, P. W., ve FELSON, D. T. (1998) Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the framingham study. *Arthritis & Rheumatism*, **41**(10):1867–1873.
- ZHANG, Z., BI, X., LI, H., ve HUANG, G. (2011) Enhanced targeting efficiency of plga microspheres loaded with lornoxicam for intra-articular administration. *Drug delivery*, **18**(7):536–544.
- Erişim Adresi: [<http://www.bouncepodiatry.com.au/conditions/leg/osteoarthritis-knee/>] Erişim Tarihi: 12/5/2016

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Bürde Süheyla
Soyadı : SUNAR
Doğum Yeri ve Tarihi : Selçuklu - 23.05.1990
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Bekar
İletişim Adresi ve Telefonu : Kuşcağz Mah. Tosyalılar Cad. No:18/10
Keçiören/ANKARA

II- Eğitim Bilgileri

2013- : A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji,
Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Eğitimi)
2007-2013 : A.Ü. Eczacılık Fakültesi (Lisans Eğitimi)
2004-2007 : Özel Nenehatun Fen Lisesi
2001-2004 : Özel Kardelen İlköğretim Okulu
Yabancı Dil : İngilizce

II- Ünvanları

2013- : Eczacı

IV- Mesleki Deneyimi

2013- : Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Ab.D. Araştırma Görevlisi
Temmuz 2014-Eylül 2014 : De Montfort University
Health and Life Sciences (ERASMUS Stajı)
Eylül 2013-Aralık 2013 : Yurtseven Fatih Eczanesi Mesul Müdürlüğü

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

TÜFTAD : Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği