



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



LİZOZİM İÇEREN MİKROPARTİKÜLLERİN İNHALASYON FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Nilhan ERDİNÇ

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Burcu DEVRİM GÖKBERK

ANKARA

2022

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİZOZİM İÇEREN MİKROPARTİKÜLLERİN
İNHALASYON FORMÜLASYONLARININ
HAZIRLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Nilhan ERDİNÇ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Burcu DEVRİM GÖKBERK

ANKARA
2022

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Lizozim İçeren Mikropartiküllerin İnhalasyon Formülasyonlarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan hazırlanmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencisinin Adı Soyadı: Nilhan Erdiñ

Tarih :

İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında

Nilhan Erdiñ tarafından hazırlanan “Lizozim İçeren Mikropartiküllerin İnhalasyon Formülasyonlarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEKLİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19.01.2022

İmza

Prof.Dr.Asuman BOZKIR

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof.Dr. Leyla AÇIK

Gazi Üniversitesi

Üye

İmza

Doç.Dr.Burcu DEVRİM GÖKBERK

Ankara Üniversitesi

Üye

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

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Solunum Sisteminin Anatomisi	2
1.2. Partiküllerin Solunum Sisteminde Tutulumuna Etki Eden Faktörler	4
1.2.1. Partikül Dansitesi	5
1.2.2. Partikül Büyüklüğü	6
1.2.3. Partikül Şekli	7
1.3. İnhalasyon Sistemleri	8
1.3.1. Nebülizerler	8
1.3.2. Ölçülü Doz İnhalerler	10
1.3.3. Kuru Toz İnhalerler	12
1.4. Pulmoner Yol ile Uygulanan İlaç Taşıyıcı Sistemler	13
1.4.1. Lipozomlar	14
1.4.2. Nanopartiküller	14
1.4.3. Mikropartiküller	15
1.4.4. Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri	17
1.4.4.1. Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi	18
1.4.5. Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	20
1.4.6. Poli(ε-kaprolakton)	21
1.5. Kistik Fibrozis	22
1.5.1. Kistik Fibroziste Tanı	24
1.5.2. KF’te Akciğer Hastalığı Tedavisi	24
1.5.3. KF’te Antibiyotik Direnci	30

1.6. Antimikrobiyal Peptitler	31
1.7. Lizozim	32
2. GEREÇ VE YÖNTEM	36
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	37
2.3. Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	38
2.4. Yöntemler	39
2.4.1. Mikrobikininik Asit (MikroBCA) Analiz Yöntemi Kullanılarak Etkin Maddenin Standart Doğru Denkleminin Hazırlanması	39
2.4.2. MikroBCA Analiz Yönteminin Validasyonu	40
2.4.2.1. Doğrusallık ve Aralığı	40
2.4.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	41
2.4.2.3. Kesinlik	41
2.4.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	42
2.4.2.5. Seçicilik	43
2.4.3. Mikropartiküllerin Hazırlanması	43
2.4.4. Çalışılan Mikropartikül Formülasyonları	44
2.4.5.1. Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi	45
2.4.5.2. Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi Tayini	45
2.4.5.3. Üretim Verimi Tayini	46
2.4.6. Optimum Mikropartikül Formülasyonunun Belirlenmesi	46
2.4.7. Optimum Mikropartikül Formülasyonunun Karakterizasyonu	47
2.4.7.1. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi	47
2.4.7.2. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Yüzey Yükünün Belirlenmesi	47
2.4.7.3. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	47
2.4.7.4. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Üretim Veriminin Belirlenmesi	47
2.4.7.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	48

2.4.7.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	48
2.4.7.7. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi	48
2.4.7.8. Çözünme Hızı Tayini	48
2.4.7.9. Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirilmesi	49
2.4.7.10. Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	49
2.4.7.11. Mikropartiküllerin Stabilitelerinin Belirlenmesi	50
2.4.8. Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Belirlenmesi	51
3. BULGULAR	52
3.1. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular	52
3.2. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular	53
3.2.1. Doğrusallık ve Aralığı	53
3.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	56
3.2.3. Ara Kesinlik	57
3.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	59
3.2.5. Seçicilik	59
3.3. 2 ⁴ Full Faktöriyel Deney Tasarımı Kullanılarak Hazırlanan Mikropartikül Formülasyonları	59
3.4. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular	61
3.4.1. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı Bulguları	61
3.4.2. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi Bulguları	62
3.4.3. Mikropartiküllere Ait İmalat Verimi Bulguları	63
3.5. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulguların İstatistiksel Analizi	64
3.6. Optimum Mikropartikül Formülasyonunun Belirlenmesi	72
3.7. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Bulgular	72
3.8. FTIR Analizine Ait Bulgular	73
3.9. DSC Analizine Ait Bulgular	74
3.10. Mikropartiküllerin SEM Analizine Ait Bulgular	76
3.11. Çözünme Hızı	76

3.12. Çözünme Hızı Kinetikleri	77
3.13. SDS-PAGE Analizine Ait Bulgular	78
3.14. Mikropartiküllerin Stabilitelerinin Belirlenmesi	79
3.15. Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerine Ait Bulgular	79
4.TARTIŞMA	80
4.1. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	80
4.1.1. Etkin Maddenin Çeşitli Ortamlardaki MikroBCA ile Analizi	80
4.1.2. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	80
4.1.2.1. Doğrusallık ve Aralığı	80
4.1.2.2. Doğruluk ve Geri Elde	81
4.1.2.3. Ara Kesinlik	81
4.1.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	81
4.1.2.5. Seçicilik	81
4.2. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	82
4.3. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	86
4.4. FTIR Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	87
4.5. DSC Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	87
4.6. Mikropartiküllerin SEM Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	88
4.7. Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi	88
4.8. SDS-PAGE Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	89
4.9. Mikropartiküllerin Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	90
4.10. Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	90
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
ÖZET	96
SUMMARY	97
KAYNAKLAR	98
EKLER	105
EK-1.	105



ÖNSÖZ

Bu çalışmada

Yüksek lisans dönemim boyunca tüm aşamalarda değerli zamanını, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, beni ailesinin bir üyesi olarak görüp her zaman sevgi ve hoşgörü ile yaklaşan, tezimin her aşamasında gösterdiği sabır, azim ve fedakarlıklarından dolayı kıymetli hocam Doç. Dr. Burcu DEVRİM GÖKBERK'e,

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi dekanı hocam Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a, beni "Farmasötik Biyoteknoloji"de yüksek lisans yapmak için cesaretlendirip, yüksek lisansa başlamama vesile olduğu ve tüm bu süre boyunca güçlü kişiliği ve karakteri ile yanımda olduğu için,

Yüksek lisansım boyunca umutsuzluğa düştüğüm anlarda beni yüreklendiren, sevgi dolu ve yol gösterici kişiliği ile beni her konuda destekleyen, deneylerimi bitirmem için gösterdiği emek ve sağladığı imkanlar için değerli hocam Prof .Dr. Leyla Açık'a,

Yükseklisans eğitimim boyunca bilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof.Dr. Nurten ÖZDEMİR'e, Prof.Dr. Nilüfer YÜKSEL'e, Prof.Dr. Ayşegül KARATAŞ'a, Prof.Dr. Tansel ÇOMOĞLU'na, Prof.Dr. Canan HASÇİÇEK'e, Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN'a, Doç.Dr. Ceyda Tuba ŞENGEL TÜRK'e, Doç.Dr. Ulya BADILLI'ya, Doç.Dr. Zerrin BAYINDIR'a, Dr.Öğr.Üyesi Özge İNAL'a, Dr.Öğr. Üyesi Ongun Mehmet SAKA'ya, Dr. Ecz. Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN'e, Dr. Ecz. Umut Can ÖZ'e teşekkür ederim.

Her zaman bana gösterdiği destek ve anlayış için, güzel kızlarımın değerli babası ve benim değerli hayat arkadaşım, eşim Fatih ERDİNÇ'e, varlıkları ile bana mutluluk veren, yaşama seviçlerim, güzel kızlarım İrem ERDİNÇ ve İzem ERDİNÇ'e,

Her zaman varlığıyla bana umut ve yol gösterici olan, çalışkan, azimli, beni ve kardeşlerimi büyük fedakarlıklarla, sevgi ve özenle yetiştiren, dünyanın en iyi annesi Canım annem Nilgün ALKAN'a,

Derdimi dert, sevincimi sevinç edinen, diğer yarım, Canım kardeşim Nihan KURT'a, varlığı ile güven veren, her türlü zorlukta yanımda olduğunu hissettiren,güzel kalpli Canım abim Mithat ALKAN'a,

Zor zamanlarımda desteklerini hiç esirgemeyen sevgili görümcem Serpil Erdinç ve sevgili kayınvalidem Nurten ERDİNÇ'e her şey için çok teşekkür ederim.

Bu çalışmaya başlamamızın amacı kistik fibrozis tedavisinde inhalasyon yolu ile uygulanmak üzere lizozim içeren mikropartiküllerin hazırlanması ve değerlendirilmesi hedeflenmektedir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%BSS	%Bağıl Standart Sapma
%EE	% Enkapsülasyon Etkinliği
%YE	% Yükleme Etkinliği
Y/S	Yağ/Su
Y/Y	Yağ/Yağ
S/Y/S	Su/Yağ/Su
S/Y/Y	Su/Yağ/Yağ
Y/S/Y	Yağ/Su/Yağ
AMP	Amtimikrobiyal Peptitler
APD	Amtimikrobiyal Peptit Veri Tabanı
DCM	Diklorometan
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (Differential Scanning Calorimetry)
HFA	Hidroflorokarbon
KFK	Kloroflorokarbon
KTI	Kuru Toz İnhaler
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi
İPF	İnce Partikül Fraksiyonu
LOD	Teşhis Sınırları (Limit of Detection)
LOQ	Tayin Sınırları (Limit of Quantification)
MA	Molekül Ağırlığı
MikroBCA	Mikro Bikinkoninik Asit
ÖDİ	Ölçülü Doz İnhaler
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG	Polietilen Glikol
PCL	Poli(ε-kaprolakton)
PVA	Polivinilalkol
r ²	Determinasyon Katsayısı
XRD	X Işını Difraktometrisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop

SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamit Jel Elektroforezi
KOAÇ	Kütlesel Ortalama Aerodinamik Çap
GSS	Geometrik Standart Sapma
İPD	İnce partikül dozu



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Solunum sisteminin şematik gösterimi	2
Şekil 1.2. Yetişkin insanlardaki solunum yolu jenerasyonlarının şematik gösterimi	4
Şekil 1.3. Jet nebülizerin şematik gösterimi	9
Şekil 1.4. Ölçülü doz inhalelerin şematik gösterimi	10
Şekil 1.5. KTİ örnekleri	13
Şekil 1.6. Mikropartiküler sistemlerin şematik gösterimi. A)Mikroküre, B)Mikrokapsül	16
Şekil 1.7. Poli(ϵ -kaprolakton)'un kimyasal yapısı	21
Şekil 1.8. KF'de inhale edilen ilaçların geçişini engelleyen anatomik ve biyolojik bariyerler	25
Şekil 1.9. Lizozimin üç boyutlu yapısının şematik gösterimi	33
Şekil 2.1. Mikropartikül hazırlanışının şematik olarak gösterimi	44
Şekil 3.1. Lizozimin distile sudaki kalibrasyon doğrusu	52
Şekil 3.2. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu	53
Şekil 3.3. Lizozimin distile su içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık grafiği	54
Şekil 3.4. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık grafiği	54
Şekil 3.5. Üretim parametrelerinin (A:lizozim konsantrasyonu, B:DCM hacmi, C:PVA hacmi ve D:homojenizasyon hızı) mikropartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisini gösteren Pareto etki grafiği	64
Şekil 3.6. Mikropartikül formülasyonlarının yüzey-yanıt grafiği (Bağımlı değişken: Partikül büyüklüğü)	65
Şekil 3.7. 2^4 full faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen lizozim miktarı (a), DCM hacmi (b), PVA hacmi (c) ve karıştırma hızının (d) mikropartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi	67
Şekil 3.8. Üretim parametrelerinin (A:lizozim konsantrasyonu, B:DCM hacmi, C:PVA hacmi ve D:karıştırma hızı) mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini gösteren Pareto etki grafiği	69

Şekil 3.9. Mikropartikül formülasyonlarının yüzey-yanıt grafiği (Bağımlı değişken: Enkapsülasyon etkinliği)	69
Şekil 3.10. 2 ⁴ faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen lizozim miktarı (a), DCM hacmi (b), PVA hacmi (c) ve karıştırma hızının (d)mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	70
Şekil 3.11. 2 ⁴ full faktöriyel deney tasarımına göre hazırlanan mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği değerlerinin istatistiksel değerlendirmesi	72
Şekil 3.12. (a) Lizozime, (b) PCL'a, (c) optimum mikropartikül formülasyonuna ait FTIR spektrumları	73
Şekil 3.13. (a) Lizozime, (b) PCL'a ve (c) optimum mikropartikül formülasyonuna ait DSC termogramları	76
Şekil 3.14. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait SEM görüntüsü	76
Şekil 3.15. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait çözünme hızı grafiği (n=3)	77
Şekil 3.16. Lizozimin SDS-PAGE ile elektroforetik analiz sonuçları. 1,10: Molekül ağırlığı belirteci; 2,3:mikropartiküllerden ekstrakte edilen lizozim; 4,5:mikropartiküllerden salınan lizozim; 6,7: 6,25 µg/ml lizozim çözeltisi; 8,9: 12.5 µg/ml lizozim çözeltisi	78

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Mikropartikül hazırlama yöntemleri	17
Çizelge 1.2. KF’te etken bakteriye göre seçilecek antibiyotik tedavisi ve dozları	27
Çizelge 1.3. KF’te kullanılan inhale antibiyotikler ve günlük dozları	28
Çizelge 3.1. Lizozimin distile sudaki kalibrasyon doğrusuna ait parametreler	52
Çizelge 3.2. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusuna ait parametreler	53
Çizelge 3.3. Lizozimin distile su içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri	55
Çizelge 3.4. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri	55
Çizelge 3.5. Lizozimin distile su içindeki miktar tayini yöntemine ait doğruluk ve geri elde bulguları	56
Çizelge 3.6. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğruluk ve geri elde bulguları	57
Çizelge 3.7. Lizozimin distile sudaki kalibrasyonu için elde edilen ara kesinlik bulguları	58
Çizelge 3.8. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponu kalibrasyonu için elde edilen ara kesinlik bulguları	58
Çizelge 3.9. Lizozimin distile sudaki ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yöntemine ait teşhis (LOD) ve tayin (LOQ) sınırı bulguları	59
Çizelge 3.10. Kullanılan 2^4 full faktöriyel deney tasarımındaki bağımsız değişkenler ve düzeyleri	60
Çizelge 3.11. 2^4 full faktöriyel deney tasarımı kullanılarak geliştirilen mikropartikül formülasyonlarının bileşenleri	60
Çizelge 3.12. 2^4 full faktöriyel tasarıma göre hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve span bulguları (n=6)	61
Çizelge 3.13. 2^4 full faktöriyel tasarıma göre hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi bulguları (n=3)	62

Çizelge 3.14. 2 ⁴ full faktöriyel deney tasarımı göre hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait imalat verimi bulguları	63
Çizelge 3.15. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait partikül büyüklüğü, span, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri (n=3)	73
Çizelge 3.16. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait in vitro salım kinetikleri	77
Çizelge 3.17. +4°C’de bekletilen mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü, span ve zeta potansiyeli değerleri (n=3)	79
Çizelge 3.18. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait İPF ve KOAÇ değerleri	79



1. GİRİŞ

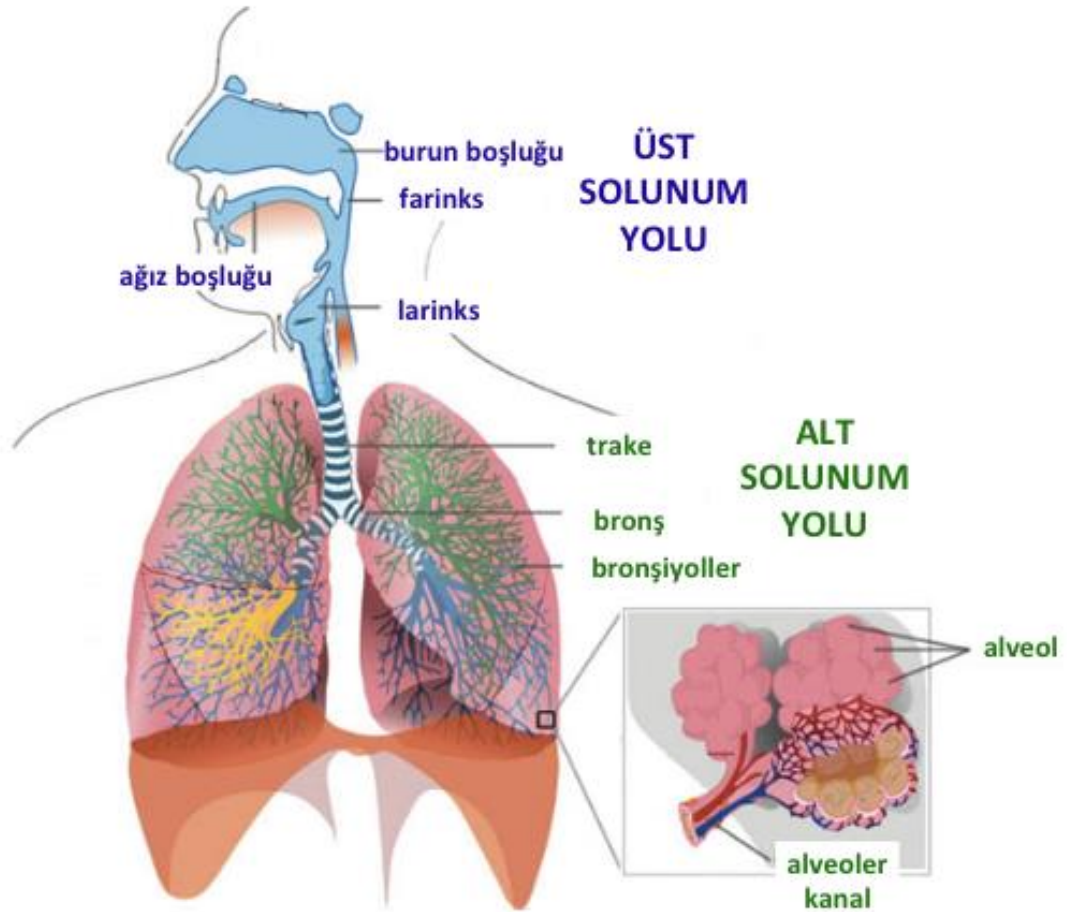
Kistik fibrozis (KF) otozomal resesif geçiş gösteren genetik ve metabolik bir hastalıktır. KF doğumdan itibaren birçok organı etkilemekle birlikte KF'deki esas morbidite ve mortalite nedeni, hava yollarındaki şiddetli obstrüksiyon, enfeksiyon ve kronik enflamasyonun kısır döngüsü ile karakterize olan akciğer değışiklikleridir. KF'li bireylerin akciğerlerinde erken yaşlarda en sık stafilokok (*Staphylococcus aureus*) ve *Haemophilus influenzae* ile, ileri yaşlarda ise *psödomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*) ile enfeksiyonlar gelişir. KF'te sık görülen enfeksiyonların tedavisi hastalıkta yaşam süresinin ve kalitesinin en önemli belirleyicisi olan akciğerlerdeki hasarın önlenmesinde temeli oluşturmaktadır. Bu nedenle KF'de enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların etkin bir antibiyotik tedavisi ile yok edilmesi çok önemlidir. KF'te antibiyotik tedavisinin temel amacı, alt solunum yollarını mümkün olduğu kadar enfeksiyonsuz hale getirmektir. Bununla birlikte, uzun süreli antibiyotik kullanımına bağılı olarak pek çok bakteride artan bir antibiyotik direnç problemi ile karşılaşmaktadır. Klasik antibiyotiklere karşı direnç gelişimindeki artış, enfeksiyöz patojenlere karşı etkili yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi gerekliliğini gündeme getirmiştir. Bağışıklık sisteminin temel bileşenleri olan antimikrobiyal peptitler ve proteinler antibiyotiklere alternatif olarak düşünölmektedir.

Bu çalışmanın amacı, inhalasyon yolu ile uygulanmak üzere KF'deki enfeksiyon etkenlerine karşı etkili mikropartiköler sistemler geliştirmek ve değlendirmektir. Antimikrobiyal etkili bir protein olan lizozim, klasik antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmıştır. Lizozimin stabilitesini korumak, akciğerlere etkili bir şekilde taşınmasını sağlamak ve salım hızını kontrol edebilmek amacıyla biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer olan polikaprolakton (PCL) kullanılarak mikropartikülleri hazırlanmıştır. Lizozim suda çözünen bir protein olduğu için mikropartiküllerinin hazırlanmasında su içinde yağ içinde su (s/y/s) tipi emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan mikropartiküllerde partiköl büyüklüğü ve dağılımı, morfoloji, yükleme etkinliğı, üretim verimi ve çözünme hızı deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara dayanarak optimum özelliklere

sahip mikropartiküller belirlenmiş ve bu mikropartiküllerin aerodinamik özellikleri değerlendirilmiştir.

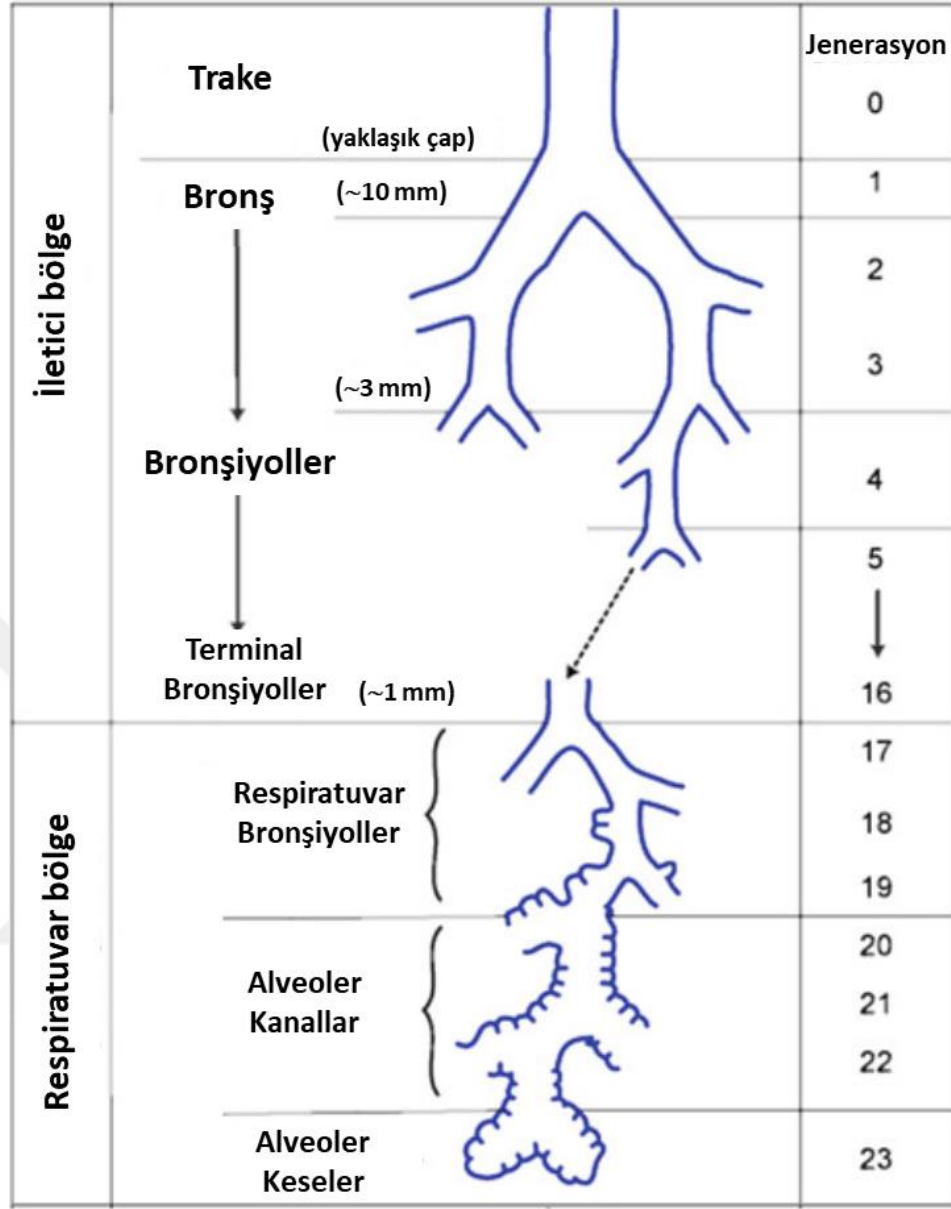
1.1. Solunum Sisteminin Anatomisi

Anatomik olarak solunum sistemi, üst ve alt solunum yolları olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Üst solunum yolu, göğüs boşluğu (toraks) dışında bulunan organları (burun, yutak ve gırtlak) içerirken, alt solunum yolu göğüs boşluğu içinde bulunan organları (trake, bronşlar, bronşiyol, alveoler kanal ve alveoller) içermektedir (Şekil 1.1) (Tu ve ark., 2013).



Şekil 1.1. Solunum sisteminin şematik gösterimi (Tu ve ark., 2013).

Trakeobronşiyal ağaç, hava yollarının üst kısmını oluşturan trake, bronşlar ve bronşiyollerden oluşan yapıdır. Bu yapı trakenin önce sağ ve sol ana bronşlara ayrılması ve daha sonra çatallanıp daha küçük hava yollarına dallanması nedeniyle ağaca benzetilmiştir. Trake (nefes borusu), gırtlaktaki krikoid kıkırdaktan akciğerlerin birincil bronşlarına bağlanan yaklaşık 11-14 cm uzunluğunda içi boş bir tüptür. Trake karinada sağ ve sol bronş olmak üzere iki ana bronşa ayrılmaktadır. Sağ bronş sol bronşa göre daha geniş ve daha kısadır (Moore ve Dalley, 2006). Bu yapı inhale edilen yabancı partiküllerin sağ bronşta daha fazla tutulmasını sağlamaktadır. Her bir ana bronş, kendi tarafındaki akciğer içine girerek lobar bronşlara ayrılmaktadır. Sağ ana bronş, üç lobar (ikincil) bronşa (sağ üst lob bronş, sağ orta lob bronş ve sağ alt lob bronş) ayrılırken, sol ana bronş ikiye (sol üst lob bronş ve sol alt lob bronş) ayrılmaktadır. Lobar bronşlar ise, her bir lobun bronkopulmoner bölümlerini besleyen segmental bronşlara (üçüncül bronşlar) ayrılmaktadır. Bu dallanma trakeobronşiyal ağaçtaki ilk üç jenerasyonu temsil etmektedir. Bronşlardaki daha küçük bronşlara dallanma 23-24 jenerasyona kadar devam etmektedir. Trakeden ayrılan sol ve sağ ana bronşların lobar ve segmental bronşlara bölündüğü ve bu çatallanma sürecinin terminal bronşiyollerle (alveol içermeyen en küçük hava yolları) devam ettiği geçiş yolu iletken hava yolları olarak adlandırılmaktadır. Terminal bronşiyoller daha sonra respiratuvar bronşiyollere, respiratuvar bronşiyoller ise alveollerle kaplı alveoler kanallara ayrılmaktadır (Şekil 1.2) (Tu ve ark., 2013).



Şekil 1.2. Yetişkin insanlardaki solunum yolu jenerasyonlarının şematik gösterimi (Tu ve ark., 2013).

1.2. Partiküllerin Solunum Sisteminde Tutulumuna Etki Eden Faktörler

İnhale edilen ilaçlar için etkin maddenin aerodinamik partikül büyüklüğü, bölgesel tutulumu etkileyen anahtar parametredir. Aerodinamik partikül çapı (d_a) Eşitlik 1 ile hesaplanmaktadır.

$$d_a = d_e \rho \sqrt{\rho_0 X}$$

Eşitlik 1

Eşitlik 1’de yer alan d_e hacim çapı, ρ küresel partikül dansitesi, ρ_0 birim dansite ve X dinamik şekil faktörüdür.

Etkili bir akciğer tutulumu için inhale edilen partiküllerin aerodinamik çapının 1-5 μm olması gerektiği kabul edilmektedir. Eşitlik 1’de de görüldüğü gibi partikül dansitesi, partikül büyüklüğü ve dinamik şekil faktörü olmak üzere üç temel faktör aerodinamik partikül çapını belirlemektedir. Düşük partikül dansitesi ve küçük geometrik partikül çapı sonuç olarak daha küçük aerodinamik partikül çapının elde edilmesini sağlamaktadır. İğne şekilli partiküller küresel partiküllerden daha yüksek şekil faktörüne sahiptir ve bu da daha küçük aerodinamik partikül çapının elde edilmesini sağlar. Bununla birlikte, iğne şekilli partiküller arasındaki etkileşim gücünün yüksek olması zayıf dağılan tozların elde edilmesine neden olur. Bu üç faktör dışında kuru toz formülasyonların aerosol performansını etkileyen faktörlerden biri de taşıyıcı ve/veya etkin maddenin yüzey enerjisidir. Partiküllerin yüzey enerjisi yüzey pürüzlülüğü değiştirilerek ya da dispersiyon artırıcı yardımcı maddeler eklenerek modifiye edilebilmektedir (Moon ve ark., 2019).

1.2.1. Partikül Dansitesi

Eşitlik 1’e göre, düşük dansiteli partiküller geometrik çaplarından daha küçük aerodinamik partikül çapına sahiptir. Bu nedenle, partikül dansitesini düşürerek daha küçük aerodinamik çapa sahip partiküller elde etmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bunlardan birisi PulmoSphere® teknolojisidir. PulmoSphere®, sünger benzeri partikül morfolojisi ile büyük yüzey alanına sahip düşük dansiteli partikülleri üretmek için kullanılan bir teknolojidir. Perflorooktil bromürün su içindeki emülsiyonundan hareketle (distearoil fosfatidil kolin ve kalsiyum klorür içeren) püskürterek kurutma teknolojisi kullanılarak 0.01–0.50 g/cm^3 sıkıştırılmış dansiteye sahip fosfolipit bazlı küçük, poröz PulmoSphere® partikülleri elde edilmiştir (Weers ve Tarara, 2014). Düşük dansiteli partiküller elde etmek için kullanılan bir diğer teknoloji ise Technosphere® teknolojisidir. Bu yöntemde PulmoSphere® teknolojisinden farklı olarak dondurarak kurutma yöntemi ile yüksek poroziteye, geniş

yüzey alanına ve düşük dansiteye sahip partiküller elde edilmiştir (Richardson ve Boss, 2007).

1.2.2. Partikül Büyüklüğü

Partikül büyüklüğü, etkin maddenin hedef bölgede etkin bir şekilde tutulumunu etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Bir aerosoldeki partiküllerin büyüklüğü 0.001-100 μm arasında değişebilmektedir. 0.1 μm 'den küçük partiküller ultra ince partiküller, 0.1-2 μm aralığındaki partiküller ince partiküller ve 2 μm 'den büyük olanlar ise kaba partiküller sınıfına girmektedir (Smola ve ark., 2008).

Hava yollarında partiküllerin tutulumu difüzyon, sedimentasyon ve durağan çarpma olmak üzere üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. 0.5 μm 'den küçük partiküller Brown hareketi nedeniyle difüzyon mekanizması ile tutulmakla birlikte mikrometre altı büyüklüğe sahip olmaları nedeniyle büyük ölçüde ekshale edilmektedirler. Sedimentasyon mekanizması aerodinamik partikül çapı 1-5 μm olan partiküllerin hava akımının düşük olduğu bronşiyollerde ve alveollerde tutulumunu sağlamaktadır. Partikül hızı ve aerodinamik çap sedimentasyonu etkileyen temel faktörlerdir. Sedimentasyon nefes alma şeklinden de etkilenmektedir. Örneğin yavaş nefes alma partiküllerin yavaş bir şekilde tutulması için uzun bir zaman aralığı sağlar. 5 μm 'den büyük partiküller ise bronşiyal bölgede durağan çarpma mekanizması ile tutulmaktadır. Durağan çarpma mekanizması büyük ölçüde partikül büyüklüğünden ve kütlesinden etkilenmektedir (El-Sherbiny ve ark., 2015).

İnhale edilen partiküllerin büyüklükleri ayarlanarak solunum sisteminin istenen bölgesinde tutulmaları sağlanabilmekle birlikte, akciğerlerdeki temel klirens mekanizmaları olan mukosilier ve makrofaj klirens mekanizmaları inhalasyon tedavisindeki en önemli engellerden birini oluşturmaktadır. Bununla birlikte, partiküllerin aerodinamik çapı ayarlanarak akciğerlerdeki klirens mekanizmalarını önlemek mümkündür. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki aerodinamik partikül çapı 1-

5 μm olan partiküller mukosilier klirensten kaçarak alt hava yollarında tutulabilmektedirler (Champion ve ark., 2008).

AERx[®] pulmoner ilaç taşıyıcı sistem, 3 μm 'den küçük aerosol üretebilen ve böylece orofarinks ve üst hava yollarında partikül tutulumunu önleyerek akciğerlerde etkili tutulum sağlayan ilk sistem olmuştur (Chan ve ark., 2014).

Partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı inhalasyon yolu ile uygulanan ilaçlar için aerodinamik partikül çapını ayarlayarak alveoler makrofajı önlemek ve derin akciğerlerde sürekli olarak etkin madde salımını sağlamak için umut verici bir yaklaşım olmuştur. Partikül bazlı ilaç taşıyıcı sistemlere başarılı bir örnek partikül büyüklüğü 5 μm 'den büyük, dansitesi ise 0.1 g/cm³ ya da daha düşük olan büyük poröz partiküllerdir. Büyük poröz partiküller makrofajlar tarafından alımı engelleyerek derin akciğerlerde homojen bir şekilde tutulabilmişlerdir (Edwards ve ark., 1998). Nanopartiküller de mukosilier klirensin ve alveoler makrofajlar tarafından fagositozun üstesinden gelmek için kullanılmış ilaç taşıyıcı sistemlere örnektir. Yapılan çalışmalar nanopartiküllerin solunum sistemini kaplayan sıvıda tutulabildiğini ve mukosilier klirensten ve alveoler makrofajlardan kaçabildiklerini göstermiştir. Bununla birlikte, nanopartiküllerin küçük boyutları inhalasyondan sonra büyük oranda ekshale edilmelerine neden olmaktadır. Bu durumun üstesinden gelmek için Trojan partiküller adı verilen yeni bir partikül bazlı pulmoner ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Trojan partiküller etkin madde yüklü nanopartikülleri içeren mikropartiküler sistemlerdir. Trojan partiküller ile nanopartiküller periferik hava yollarına taşınarak pulmoner klirensten kaçabilmiştir. Bu tip partiküller nanopartiküllerin püskürtülerek kurutulması ile hazırlanmakta ve düşük dansiteye sahip içi boş mikropartiküller şeklinde elde edilmektedirler (Tsapis ve ark., 2002).

1.2.3. Partikül Şekli

Partikül şekli aerodinamik partikül büyüklüğünü etkileyen bir diğer önemli faktördür. İğne şekilli partiküller yüksek şekil faktörü değerine sahip oldukları için

aerodinamik çapı küçültebilirler. Böylece iyileştirilmiş aerosol performansı ve akciğerlerde etkili ilaç tutulumu sağlayabilirler. Ayrıca, uzun partiküllerin fagositoz aracılığıyla makrofajlar tarafından uzaklaştırılması daha zordur. Bununla birlikte, küresel olmayan partiküllerin tekrarlanabilir partikül boyutunda elde edilmeleri oldukça zordur (El-Sherbiny ve ark., 2015).

1.3. İnhalasyon Sistemleri

Kistik fibroziste (KF) en sık tutulan ve mortaliteye en çok neden olan organ akciğerler olduğu için, solunum sisteminin tedavisi büyük önem taşır.

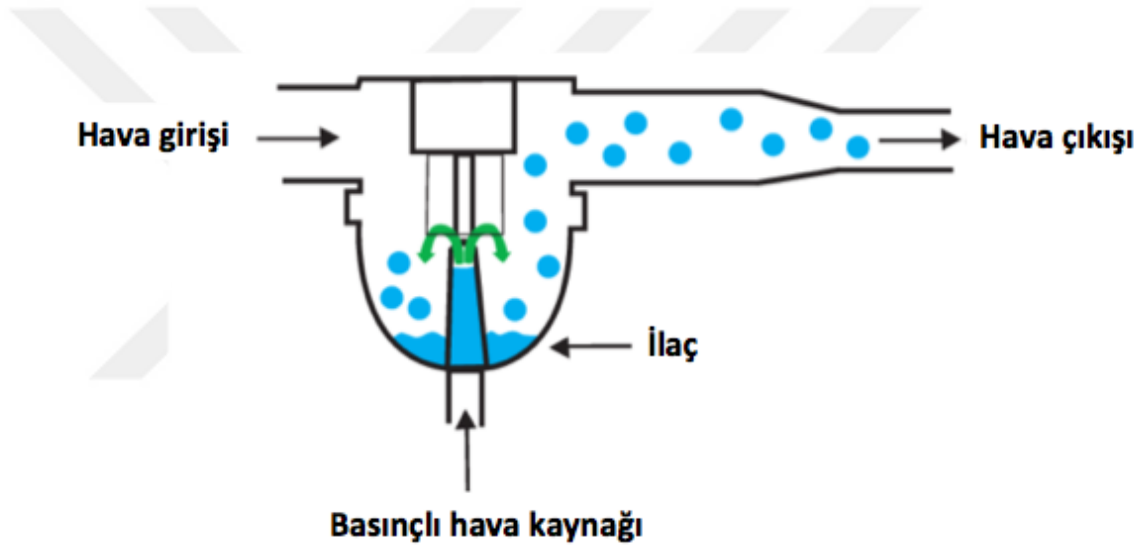
İnhaler tedavide amaç, daha az miktarda ilacı en kısa sürede, doğrudan solunum yollarına vermektir. KF’te inhalasyon yolu ile tedavi, solunum yolu obstrüksiyonunun düzeltilmesi, mukus klirensinin düzenlenmesi, bronşiyal ağacın mikrobiyal yükünün azaltılması ve kronik *Pseudomonas aeruginosa* kolonizasyonunda antibiyotik tedavisi amacı ile kullanılmaktadır.

İnhalasyon sistemleri, etkin maddenin önceden belirlenmiş miktarının akciğerlere etkin bir şekilde uygulanmasını sağlayan sistemlerdir. Bu sistemler aerosolü oluşturmak için kullanılan teknoloji ve uygulanan formülasyon bakımından farklılık göstermektedir. İnhalasyon sistemleri; nebülizerler, ölçülü doz inhalerler ve kuru toz inhalerler olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilmektedir.

1.3.1. Nebülizerler

Nebülizerler, sulu çözelti veya süspansiyon formundaki ilaçları aerosol formuna getirmek için tasarlanmış cihazlardır. Nebülizerlerin, jet nebülizerler ve ultrasonik nebülizerler olmak üzere iki temel tipi bulunmaktadır (Carvalho TC ve McConville, 2016).

Jet nebulizerler, bir kompresör tarafından üretilen itici gaz (hava veya oksijen) aracılığı ile sıvıyı atomize etmektedir (Şekil 1.3). Kompresör tarafından üretilen basınçlı havanın cihazdaki odacık içine girdiği noktada hava akımı hızlanarak “jet akım”a dönüşmektedir. Jet akım, çevredeki atmosfer basıncına göre daha negatif bir basınç oluşturmakta ve oluşan bu negatif basınç çözeltinin ince bir tüpten hava akımına doğru hareket etmesini sağlamaktadır. Gelen sıvı, hızlı hava akımının etkisiyle atomize olarak küçük damlacıklara ayrılmaktadır. Atomizasyonla oluşan sıvı damlacıkların çapı (15-500 μm) alt solunum yollarına ulaşacak kadar küçük değildir. Sıvı damlacıkları önlerinde bulunan engele (“baffle”) çarptığı zaman inhale edilebilecek küçük damlacıklara parçalanmaktadır (Frijlink ve de Boer, 2007).



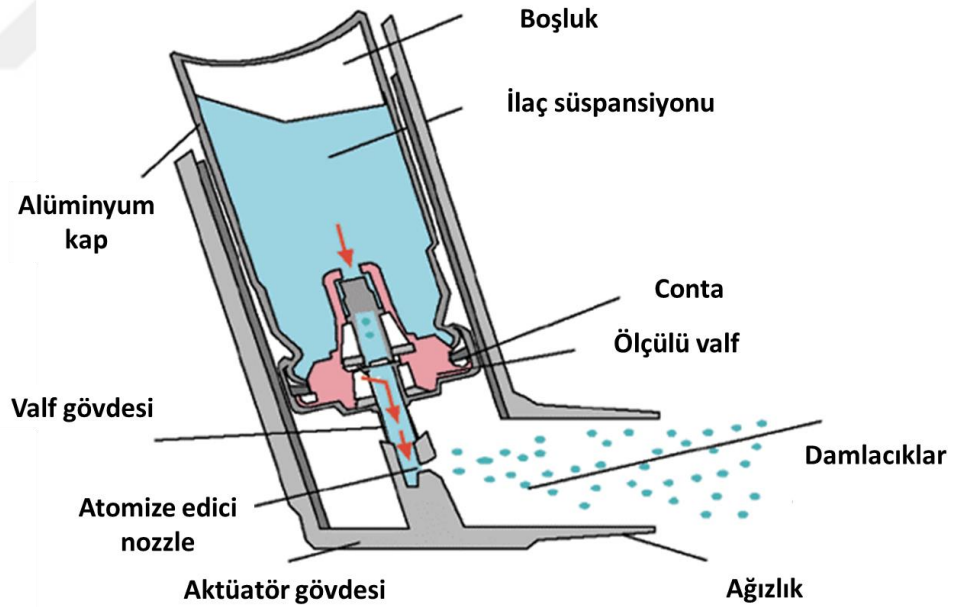
Şekil 1.3. Jet nebulizerin şematik gösterimi. (Frijlink ve de Boer, 2007).

Ultrasonik nebulizerlerde, damlacıklar hızla titreşen piezoelektrik kristal aracılığıyla oluşturulan yüksek frekanslı ses dalgalarının sıvıya iletilmesi ile oluşmaktadır. Sıvının damlacık büyüklüğü kristalin titreşme sıklığı ile belirlenmektedir. Ses dalgalarının oluşturduğu titreşim doğrudan ilaç deposundaki çözeltiye iletilmektedir. Sıvı yüzeyinde oluşan kapiler dalgaların tepe noktalarında meydana gelen kopmalar damlacıkları oluşturmaktadır. Ultrasonik nebulizerler jet nebulizerlerden daha hızlı ve daha küçük oldukları için kullanımları daha kolaydır (O’Callaghan ve Barry, 1997).

Nebülizerlerin en önemli dezavantajı, uygulanan ilacın yalnızca % 1'inin hasta tarafından inhale edilmesidir. Ayrıca, nebülizerlerde inhale edilebilir damlacıkların oluşumu sırasında sıvı üzerine yüksek basınç uygulanması, özellikle peptitler ve proteinler gibi stabilize sorunu olan ilaçlar için sakıncalı bir durumdur (Flament ve ark.,1999).

1.3.2. Ölçülü Doz İnhalerler

Ölçülü doz inhalerler (ÖDİ), nebülizerler ile yaşanan sorunların üstesinden gelmek için geliştirilmiş ilk taşınabilir inhalasyon sistemleridir. ÖDİ'ler, uygun bir kap içerisinde bir itici gaz ile basınç altında tutulan çözelti, süspansiyon veya emülsiyonları ölçülü valfi ile püskürtürken damlacık haline getiren cihazlardır (Şekil 1.4) (Myrdal ve ark., 2014).



Şekil 1.4. Ölçülü doz inhalerlerin şematik gösterimi. (Myrdal ve ark., 2014).

ÖDİ'lerde en yaygın olarak kullanılan itici gaz kloroflorokarbondur (KFK). KFK, basınç uygulandığında kolayca sıvı hale gelmekte, atmosfere püskürtüldüğünde ise hızla buharlaşmakta ve kendisiyle birlikte hareket eden maddenin püskürtülen yöne iletilmesini sağlamaktadır. KFK'ların biyolojik olarak inert olmaları önemli bir avantajdır. Ancak, KFK'lar soğuk aerosol oluşumuna neden olmaktadır (Gabrio ve ark., 1999). Soğuk freon etkisi olarak bilinen bu durum uygulanan dozun yaklaşık olarak % 90'ının orofaringeal bölgede tutulması ile sonuçlanmaktadır (Leach ve ark., 1998). Bu nedenle, hidrofloroalkanlar (HFA) KFK'lara bir alternatif olarak incelenmiştir. Toksikolojik incelemeler HFA'ların toksik, karsinojenik, mutojenik olmadığını ve vücutta birikmediğini göstermiştir (Taylor, 2002).

ÖDİ'lerde formülasyon tipi olarak genellikle etkin maddenin itici gaz içindeki çözeltisi tercih edilmektedir. Etkin maddenin itici gaz içinde etkili bir şekilde çözünmemesi durumunda formülasyonlar mikronize haldeki etkin maddelerin itici gaz içindeki süspansiyonu şeklinde hazırlanmaktadır.

ÖDİ formülasyonlarında çözelti veya stabil süspansiyonların hazırlanması için etanol veya gliserol gibi yardımcı çözücüler veya düşük miktarlarda oleik asit veya Tween 80 gibi sürfaktanlar kullanılmaktadır. Yardımcı çözücüler aerosoldeki damlacık büyüklüğünü küçültmek için de kullanılabilir (Brambilla ve ark., 1999).

ÖDİ'lerin en önemli dezavantajı, ilacın cihazdan püskürtülüp inhale edilmesi sırasında el-ağız koordinasyonu gerektirmesidir. Bu nedenle özellikle çocuklar ve yaşlılar tarafından kullanımlarında zorluklarla karşılaşılabilir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, ÖDİ ile ağız arasına hava odacıkları yerleştirilmiştir (Myrdal ve ark., 2014).

1.3.3. Kuru Toz İnhalerler

Kuru toz inhalelerler (KTİ), ÖDİ'lerde yaşanan sorunları ortadan kaldırmak için tasarlanmış sistemlerdir. KTİ'lerde etkin madde katı halde bulunmaktadır. Bu durum etkin madde stabilitesi, kullanım kolaylığı ve uygulanan doz miktarı aralığı bakımından avantaj sağlamaktadır. Etkin madde bir toz formülasyonu içinde yer aldığı için parçalanma, ayrışma ve mikrobiyolojik kontaminasyon riskleri en az düzeydedir (Yang ve ark., 2014).

KTİ'lerde ilacın aerosol hale gelebilmesi için gereken enerji hastanın inspirasyonu ile sağlanmaktadır. Etkili bir inhalasyon için inspirasyon hızının en az 30 l/dakika olması gerektiği bildirilmiştir (Coates ve ark., 2005).

KTİ'lerin, nebulizerler ve ÖDİ sistemlerine göre önemli bazı avantajları bulunmaktadır. Nebulizerler ile karşılaştırıldıklarında, daha yüksek dozda ilaç inhale edilebilmektedir. Ayrıca KTİ'ler nebulizelere göre daha küçük, ucuz ve taşınabilir sistemlerdir. KTİ'lerde itici gaz kullanımının gerekmemesi ÖDİ'lere göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Hastanın inspirasyonu ile harekete geçen cihazlar oldukları için, KTİ sistemlerinde hastanın el-ağız koordinasyonuna da gerek yoktur. Akciğerlerde tutulan ilaç miktarları karşılaştırıldığında ise, KTİ'ler ile uygulanan aynı doz ilaç akciğere yaklaşık iki kat fazla ulaşmakta, orofarinkste biriken miktar ise daha az olmaktadır (Smitha ve Parry-Billings, 2003; Telko ve Hickey, 2005).

KTİ'ler dozlama mekanizmalarına göre tek dozluk veya çok dozluk sistemler olarak sınıflandırılabilirler. Tek dozluk sistemlerde, toz formülasyonunun birim dozu, bir kapsül veya blistere doldurulmaktadır. Bu amaçla geliştirilen Spinhaler®, Rotahaler® ve Aerolizer® birim dozu sert jelatin kapsül içinde içeren KTİ'lerdir. Diskhaler® ve Diskus® gibi cihazlarda ise birim doz blisterler içinde yer almaktadır (Yang ve ark., 2014).

Tek dozluk sistemlere alternatif olarak çok dozluk sistemler kullanılabilir. Çok dozluk sistemlerde doz ayarlaması, bir disk içindeki delikler (Turbuhaler®) veya bir blisterdeki boşluklara (Novolizer®) tozun volumetrik ölçümü ile sağlanmaktadır. Çok dozlu sistemlerde toz formülasyonunun akış özelliğinin ve homojenitesinin iyi ayarlanmış olması gerekmektedir (Berkenfeld ve ark., 2015).



Şekil 1.5. KTİ örnekleri.

1.4. Pulmoner Yol ile Uygulanan İlaç Taşıyıcı Sistemler

Pulmoner hastalıkların tedavisi için ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması, akciğerlerde lokal tedavi için potansiyel olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. Pulmoner yol ile uygulanan ilaç taşıyıcı sistemler; etkin maddeyi enzimatik parçalanmaya karşı korumak, etkin maddeyi akciğerlerde hedeflenen bölgeye taşımak, kontrollü etkin madde salımı sağlamak, doz sıklığını azaltmak, terapötik etkinliği artırmak ve yan etkileri azaltmak gibi pek çok avantaja sahiptir. Bu amaçla başta lipozomlar, nanopartiküller, mikropartiküller, siklodekstrin kompleksleri, miseller ve mikroemülsiyonlar olmak üzere pek çok ilaç taşıyıcı sistemden yararlanılmaktadır.

1.4.1. Lipozomlar

Lipozomlar, küresel şekilli, bir ya da birden fazla lipit çift tabakadan oluşan orta iç kısmında ve tabakalar arasında sulu faz bulunduran kapalı veziküllerdir (Erdoğan, 2014). Lipozomlar yapıtaşları olan fosfolipitlerin su içinde disperse edilmesi sonucu oluşurlar. Lipozomlar nanometreden mikrometreye kadar çok çeşitli boyutlarda hazırlanabilmektedirler. Lipozomların özellikleri genel olarak lipit bileşimine, büyüklüğe, yüzey yüküne ve hazırlama yöntemine bağlı olarak değişmektedir. Lipozomlar hücre membranının yapısında bulunan fosfolipitlerden hazırlandıkları için biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve nontoksiktir. Lipozomların lipit tabakasını oluşturan doğal ya da sentetik fosfolipitlerin amfifilik özellikte olması lipozomlar ile hem hidrofilik hem de lipofilik etkin maddelerin taşınabilmesine olanak sağlamaktadır. Birçok etkin madde, pulmoner yolla verilmesini düzeltmek için lipozomlara yüklenmiştir. Lipozomların en önemli dezavantajı ise fiziksel ve kimyasal stabilitelerinin düşük olması nedeniyle kısa yarılanma ömrüne sahip olmalarıdır. Lipozomlarda en sık görülen fiziksel stabilite sorunlarından birisi vezikül agregasyonuna bağlı olarak görülen partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımının değişmesidir. Diğer bir fiziksel stabilite sorunu ise membran geçirgenliğinin değişmesi sonucunda yüklü etkin madde kaybıdır. Kimyasal stabilite sorunları ise fosfolipitlerin oksidasyonu ve hidrolizi sonucu görülmektedir. Fosfolipitlerin kimyasal degradasyonu lipit çift tabakanın geçirgenliğinin değişmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu durum lipozomlarda etkin madde salım profilinin ve buna bağlı olarak terapötik etkinliğin değişmesine neden olmaktadır. Ayrıca, lipozomlar düşük etkin madde kapasitesine sahiptirler (Pulivendala ve ark., 2020).

1.4.2. Nanopartiküller

Nanopartiküller, büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu doğal veya sentetik polimerlerden hazırlanan katı kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Etkin madde nanopartikül içinde çözünmüş ya da disperse edilmiş olabileceği gibi yüzeyine adsorbe edilmiş ya da

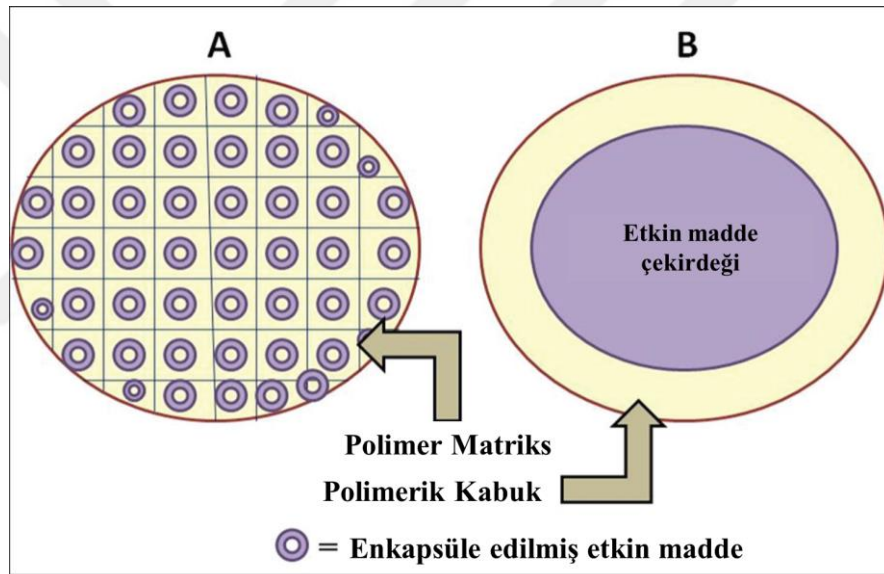
kovalan olarak bağlanmış da olabilir. Nanopartiküller diğer ilaç taşıyıcı sistemler ile karşılaştırıldıklarında pek çok avantaja sahiptirler. Nanopartiküller nano ölçekli boyutları sayesinde hücre membranlarından, bariyerlerden ve kapillerlerden kolayca geçebilmektedirler. Nanopartiküller lipozomlar ile karşılaştırıldıklarında daha yüksek stabiliteye ve etkin madde yükleme kapasitesine sahiptirler. Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonuna uygun olmaları hedeflendirici ajanlar ile modifiye edilerek istenen hedef bölgeye taşınabilmelerini sağlamaktadır. Bununla birlikte, nanopartiküllerin spesifik büyüklük dağılımında sentezlenmeleri ve hedef bölgede istenen süre boyunca kalmalarının sağlanması oldukça zor ve karmaşıktır. Bu nedenle, nanopartiküllerin fizyolojik ortamdaki davranışlarını belirlemek için uygun fizikokimyasal özelliklerinin (büyüklük, yüzey kimyası ve şekli) iyi tanımlanması gerekmektedir. Partikül-partikül etkileşimleri, agregat oluşturma eğilimleri, serum proteinlerinin nanopartiküllere adsorpsiyonu ve immünolojik reaksiyona neden olma potansiyelleri nanopartiküler sistemlerin tasarlanmasında göz önünde bulundurulması gereken parametrelerdir (Lee ve ark., 2015). Nanopartiküler sistemlerin karmaşıklığı, partikül özelliklerinin spesifik yönleri ile doğrudan ilişkili olan çeşitli toksisitelere yol açmaktadır. Nanopartiküllerin küçük boyutu, geniş yüzey alanı ve reaktivite biyolojik moleküller ile etkileşimi kolaylaştırarak pulmoner toksisiteye neden olmaktadır. Yapılan hayvan çalışmaları nanopartiküllerin akciğerlerde hasara yol açabileceğini göstermiştir (Bakand ve Hayes, 2016).

1.4.3. Mikropartiküller

Mikropartiküller; 1-1000 µm arasında değişen boyutlarda, içerdikleri etkin maddenin moleküler düzeyde veya makroskobik partiküller halinde disperse edildiği, vücutta parçalanabilen veya parçalanamayan, farklı yüzey ve yığın yapılarında hazırlanabilen, monolitik yapıda, katı, küresel, partiküller şeklindeki mikro taşıyıcılardır. Mikropartiküllere enkapsüle edilen etkin madde mikropartikül içinde katı, çözelti, süspansiyon veya emülsiyon şeklinde bulunabilir. Mikropartiküllerin kullanım amacına göre; büyüklük ve büyüklük dağılımı, yoğunluğu, yüzey veya yığın

yapısı, gözenekliliği ve biyouyumluluğu uygulama alanı seçiminde önemli ölçütlerdir (Kaş, 2002).

Mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, mikroküreler ve mikrokapsüller olmak üzere iki temel grup altında incelenmektedir (Şekil 1.6). Mikroküreler; küresel şekle ve geniş yüzey-hacim oranına sahip, etkin maddenin matrisi içinde homojen olarak dağıtıldığı mikropartiküllerdir. Mikrokapsüller ise etkin maddenin çekirdekte yer aldığı ve polimerik bir kabuk ile çevrelendiği depo sistemlerdir. Mikropartikül tipi enkapsüle edilen etkin maddeye ve kullanılan polimere bağlı olarak oluşturulabilmektedir (Bale ve ark., 2016).



Şekil 1.6. Mikropartiküler sistemlerin şematik gösterimi. A) Mikroküre, B) Mikrokapsül. (Bale ve ark., 2016).

Lipozomlar ile karşılaştırıldıklarında, mikropartiküller in vitro ve in vivo koşullarda fizikokimyasal olarak daha stabildir ve bu nedenle enkapsüle edilmiş etkin maddenin daha yavaş salınmasını ve daha uzun süre etki etmesini sağlayabilmektedir.

Son yıllarda, mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ve özellikle polimerik mikropartiküller üzerinde çok fazla sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar mikropartiküllerin umut verici kontrollü ve sürekli salım yapan ilaç taşıyıcı sistemler olduklarını göstermiştir. Lupron Depot®, Zoladex® ve Nutropin Depot® polimerik

mikropartikül bazlı ticari ürünlere örnektir. Mikropartiküller klasik ilaç şekilleri ile karşılaştırıldıklarında etkin maddenin artmış rölatif biyoyararlanımı, yüksek stabilite ve uzun raf ömrü, terapötik etki için daha düşük dozlara gereksinim olması, azalmış yan etki ve toksisite riski, etkin maddenin belli bir süre boyunca sürekli ve kontrollü salımı, hedeflendirilmiş ilaç taşınması, GI kanalda düşük çözünürlüğe ve absorpsiyona sahip olan etkin maddelerin biyoyararlanımının artırılması, düşük immünojenisite, canlı hücre enkapsülasyonu, yüksek etkin madde yükleme kapasitesi ve yüksek hasta uyuncu gibi pek çok avantaja sahiptir. Mikropartiküllerin dezavantajları büyük ölçekli üretimlerinin zor oluşu, aktif maddenin mikropartiküllerin hazırlanması sırasında inaktivasyonu/degradasyonu ve etkin madde salım hızının kontrolünde karşılaşılan güçlüklerdir (Pulivendala ve ark., 2020).

1.4.4. Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri

Mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemler Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Mikropartikül hazırlama yöntemleri.

Çözücü Ekstraksiyon/ Buharlaştırma Yöntemi	a) Basit emülsiyon
	-Su içinde yağ tipi emülsiyon oluşturma çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi (Y/S yöntemi)
	-Yağ içinde yağ tipi emülsiyon oluşturma çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi (Y/Y yöntemi)
	b) Çoklu emülsiyon
	-Su içinde yağ içinde su tipi emülsiyon oluşturma çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi (S/Y/S yöntemi)
	-Yağ içinde yağ içinde su tipi emülsiyon oluşturma çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi (S/Y/Y yöntemi)
	-Yağ içinde su içinde yağ tipi emülsiyon oluşturma çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi (Y/S/Y yöntemi)
	-Su içinde yağ içinde yağ içinde su tipi emülsiyon oluşturma çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi (S/Y/Y/S yöntemi)

	-Yağ içinde yağ içinde yağ içinde su tipi emülsiyon oluşturma çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi (S/Y/Y/Y yöntemi)
	c) Katı dispersiyon içerenler
	Su içinde yağ içinde katı tipi emülsiyon oluşturma çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi (K/Y/S yöntemi)
	Su içinde yağ içinde su içinde katı tipi emülsiyon oluşturma çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi (K/S/Y/S yöntemi)

Çizelge 1.1.Mikropartikül hazırlama yöntemleri.

Faz Ayrışması (Koaservasyon) Yöntemi	a) Basit koaservasyon
	b) Kompleks koaservasyon
Polimerizasyon Yöntemi	a) Emülsiyon polimerizasyonu
	b) Süspansiyon polimerizasyonu
	c) Misel polimerizasyonu
Sıcakta Eritme Yöntemi	
Emülsiyon Çözücü Difüzyon Yöntemi	
Küresel Kristalizasyon Yöntemi (Kuasi-Emülsiyon Çözücü Difüzyon Yöntemi)	
Ekstrüzyon - Küreselleştirme Yöntemi	
Dondurarak Kurutma Yöntemi	
Püskürterek Kurutma Yöntemi	
Süperkritik Sıvı Yöntemi	
Delik (Orifice) Yöntemi	
Termoreversibl Jel Yöntemi	

1.4.4.1. Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi

Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi polimerik mikropartiküllerin hazırlanmasında en eski ve yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu yöntem ile mikropartiküllerin hazırlanması dört temel basamaktan oluşmaktadır:

- i) Etkin maddenin matris materyali içeren organik bir çözücü içinde çözülmesi veya disperse edilmesi;
- ii) Organik fazın birinci ile kısmen karışabilen ikinci bir sürekli faz ile emülsifikasyonu;

- iii) Çözücünün sürekli faz aracılığıyla dispers fazdan ekstraksiyonu ve buharlaşması;
- iv) Mikropartiküllerin ayrılması ve kurutulması (Freitas ve ark., 2005).

Etkin madde polimerik materyalin organik çözücüdeki çözeltisine uygun bir çözücü içinde çözülerek, ince katı partiküller şeklinde disperse edilerek ya da polimer çözeltisi ile kısmen karışabilen sulu çözeltisinin emülsifikasyonu şeklinde eklenebilmektedir. Katı ya da çözünmüş haldeki etkin maddenin polimer içeren çözelti içindeki emülsifikasyonu ultrasonikasyon, yüksek hızlı karıştırıcılar ile emülsifikasyon veya mikrofludizasyon ile sağlanmaktadır. Bu şekilde hazırlanan dispers faz, polimerin çözünmediği bir çözücünden oluşan sürekli faza eklenerek emülsiyon oluşumu sağlanmakta ve bir dispersiyon ajanı yardımıyla emülsiyon stabilize edilmektedir. Oluşan emülsiyon oda sıcaklığında karıştırılarak, sıcaklık veya vakum uygulanarak organik çözücünün mikrometre boyutundaki damlacıklardan difüze olması ve ardından da buharlaşması sağlanmaktadır. Organik çözücünün buharlaşması ile polimer ve etkin madde küresel partiküller halinde kristallenmekte ve sistem bir süspansiyon formuna dönüşmektedir. Oluşan mikropartiküller filtrasyon veya santrifüj ile ayrılmakta, yıkanmakta ve kurutulmaktadır (Herrmann ve Bodmeier, 1998).

Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi ile yağ/su (Y/S), yağ/yağ (Y/Y), su/yağ/su (S/Y/S), su/yağ/yağ (S/Y/Y) ya da yağ/su/yağ (Y/S/Y) tipi emülsiyonlardan hareketle mikropartiküller hazırlanabilmektedir. Peptit ve proteinler gibi suda çözünen etkin maddelerin enkapsülasyonu için genellikle S/Y/S tipi emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmaktadır. S/Y/S emülsiyon sisteminde, etkin madde su ya da uygun bir tampon çözeltisinde çözülürken (iç sulu faz), polimer ise su ile karışmayan organik bir çözücüde çözülmemektedir (organik faz). Daha sonra, iç sulu faz organik faza eklenerek su/yağ (S/Y) tipi primer emülsiyon oluşumu sağlanmaktadır. Oluşan S/Y emülsiyonu, S/Y/S sekonder emülsiyonu oluşturmak üzere sürfaktan içeren sulu faza (dış sulu faz) eklenmektedir. Sekonder emülsiyon sürekli karıştırılarak organik çözücünün uzaklaşması sağlanmakta ve etkin

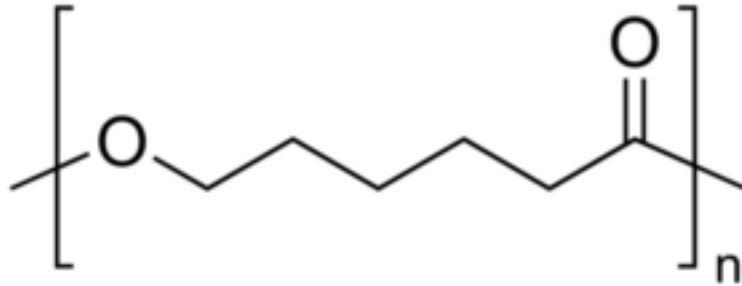
madde yüklü katı mikropartiküller oluşmaktadır (Couvreur ve ark., 1997; Meng ve ark., 2003).

1.4.5. Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Mikropartiküllerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Doğal polimerler arasında lipitler, aminopolisakkaritler, proteinler, karbonhidratlar; sentetik polimerler arasında ise biyolojik olarak parçalanabilen ve parçalanmayan polimerler yer almaktadır. Doğal polimerler biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak geçimli olmaları, metabolize edilebilmeleri, stabiliteleri ve büyüklük dağılımlarının kontrol edilebilir olması ve suda çözünen etkin maddeler için yüksek yükleme kapasitesine sahip olmaları nedeniyle tercih edilirler. Sentetik polimerler ile karşılaştırıldıklarında saflıkları daha düşük olabilmekte ve fizikokimyasal özellikleri daha zor kontrol edilebilmektedir. Doğal polimerler bazı durumlarda immünojenik aktivite gösterebilmektedirler. Sentetik polimerler ise, istenilen spesifikasyonlara göre sentezlenebilme, hazırlama ve saklama süresince dayanıklı olma, fazla miktarda ve yüksek saflıkta üretilme gibi avantajlara sahiptirler (Kaş, 2002, Şenel, 2014). Mikropartiküllerin hazırlanmasında en yaygın olarak kullanılan ve biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimerler poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit), poli(hidroksi bütirat), poli(ε-kaprolakton) ve poli(dioksanonlar) gibi poliesterler, poli(sebazik asit) ve poli(adipik asit) gibi polianhidritler, poli(imino karbonatlar) ve poliamino asitler gibi poliamitler, poli(siyano akrilatlar) ve poliüretanlardır. Selüloz türevleri (karboksimetil selüloz, etil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, selüloz asetat), silikonlar, akrilik polimerler (polimetakrilatlar), polivinil pirolidon, etil vinil asetat, poloksamerler ve poloksaminler ise biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerlere örnektir (Şenel, 2014).

1.4.6. Poli(ε-kaprolakton)

Poli(ε-kaprolakton) (PCL) biyolojik olarak parçalanabilen ve tekrarlayan hekzanoat ünitelerinden oluşan alifatik bir poliesterdir. Şekil 1.7’de PCL’ün kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 1.7. Poli(ε-kaprolakton)’un kimyasal yapısı. (Siddiqui ve ark., 2018)

PCL, ε-kaprolakton monomerlerinden halka açma polimerizasyonu ile elde edilmektedir. PCL’nun ortalama molekül ağırlığı 530-630,000 arasında değişmektedir. Düzenli yapısından dolayı yarı kristalin bir polimerdir ve erime sıcaklığı (59-64 °C) vücut sıcaklığının üstündedir. Bununla birlikte, Tg değeri -60 ° C’dir. Oda sıcaklığında, kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, tolüen, sikloheksanon ve 2-nitropropan gibi pek çok organik çözücünde çözünmektedir. Aseton, asetonitril, 2-bütanon, dimetilformamid ve etil asetat az çözünmektedir. Alkoller, dietil eter, petrol eteri ve suda ise çözünmemektedir (Siddiqui ve ark., 2018; Malikmammadov ve ark., 2018).

PCL diğer poliesterler ile karşılaştırıldığında, tekrar eden birimlerinde beş hidrofobik kısım bulunması nedeniyle daha yavaş bozunur. Ayrıca PCL’un alifatik ester bağlarının hidrolize duyarlılığı nedeniyle, fizyolojik koşullar altında bir hidrolitik mekanizma ile bozunabileceği doğrulanmıştır (Thibaudeau ve ark., 2014). PCL’un degradasyonu molekül ağırlığına, şekline ve kalıntı monomer içeriğine bağlıdır. Genel olarak, PCL’un biyolojik ortamda tam olarak bozunması 2-3 yıl sürmektedir. PCL’un enzimatik degradasyonu lipaz enziminin etkisi ile gerçekleşmektedir. Ortam pH’sı

polimerin bozunma hızı üzerinde etkilidir. PCL alkali ortamda asidik ortama göre daha hızlı bozunmaktadır. Bozunma ürünü olan 6-hidroksikaproik asit, hücre tarafından alınarak sitrik asit döngüsünde 3-asetil CoA moleküllerine dönüşmekte ve böbrekler aracılığıyla vücuttan atılmaktadır (Malikmammadov ve ark., 2018).

PCL'un biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak geçimli bir polimer olması nedeniyle pek çok etkin maddenin (sisplatin, doksisiklin, tetrasiklin, karboplatin, kurkumin, deksametazon, paklitaksel ve ketoprofen gibi) ilaç taşıyıcı sisteminin hazırlanması için polimer olarak kullanılmıştır. PCL'un insanlarda kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Son yıllarda, anti-enflamatuvar deksametazon (Visser ve ark., 2015), anti-tüberküloz etkili izoniazid (Aishwaryave ark., 2008) ve pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde kullanılan resveratrolün pulmoner verilişi için solunabilir kuru toz formülasyonlarının hazırlanmasında polimer olarak PCL kullanılmıştır (Ghosh ve ark., 2010). Ayrıca, PCL kullanımının polimer yıkımı sırasında asidik monomerlerin üretilmesi nedeniyle etkin madde stabilitesini etkileyebilecek poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ile karşılaştırıldığında peptitler ve proteinler gibi aside duyarlı etkin maddeler için avantajlı olduğu bildirilmiştir (Hong ve Kim, 2011).

1.5. Kistik Fibrozis

Kistik fibrozis (KF); beyaz ırkta daha sık görülen otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır. KF multisistemik bir hastalık olmakla birlikte esas morbitide ve mortalite nedeni hava yollarındaki şiddetli obstrüksiyon, enfeksiyon ve kronik enflamasyonun kısır döngüsü ile karakterize akciğer değişiklikleridir (Lobo ve ark., 2012).

KF'in görülme sıklığı 2000-3500 doğumda bir olmakla birlikte hastalık insidansı popülasyonlar arasında değişkenlik göstermektedir. Ülkemizde akraba evliliklerinin sık olması nedeniyle hastalığın insidansının daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Türk Toraks Derneği Kistik Fibrozis Tanı ve Tedavi Rehberi, 2011).

KF; “Kistik Fibrozis Transmembran Regulator (KFTR)” adlı proteini kodlayan gende (7q31.3) meydana gelen mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. KFTR proteini; havayolu epiteli, pankreas, submukozal bezler, karaciğer, üreme organları ve ter bezleri gibi hücre tiplerinde bulunur. KFTR proteini epitel dokuda sıvı ve elektrolit transferinde görev alan bir proteindir. KFTR proteinindeki yapısal ve fonksiyonel bozukluklar sonucunda bu proteini taşıyan bölgelerdeki epitel membranında klor transportu bozulmaktadır. Klor transportunda meydana gelen değişiklikler sekresyonların dehidratasyonuna ve bu proteinin bulunduğu organlardaki mukus salgılarının viskozitelerinin artmasına neden olur. KFTR proteini birçok hücrede bulunmakla birlikte bu proteinin bozuk olduğu durumlarda en çok akciğerler ve gastrointestinal sistem etkilenmektedir. Solunum yollarında sekresyonun kalınlaşması nedeniyle oluşan mukus tıkaçları akciğerde obstrüktif kalıcı değişiklikler ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, tıkaç oluşumu ve mukosiliyer mekanizmaların işlev görememesi nedeniyle alt solunum yollarında tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar oluşmaktadır. Tekrarlayıcı enfeksiyonlar erken dönemde geçici semptomlara sebep olurken hastalığın ilerleyen dönemlerinde bronşiektazi gibi kalıcı patolojilere yol açmaktadır (Riordan, 2008).

Solunum yolu enfeksiyonları KF’te morbidite ve mortaliteden en sık sorumlu olan klinik durum olarak kabul edilmektedir. KF’li hastaların solunum yollarında *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* ve *Pseudomonas aeruginosa* olmak üzere üç majör mikroorganizma kolonizasyona ve enfeksiyona yol açmaktadır. Hastalığın erken evrelerinde *S. aureus* ve *H. influenzae* ile daha sık karşılaşılır. Hastalık ilerledikçe ve yaygın antibiyotik kullanımına bağlı olarak *P. aeruginosa* etken olmaya başlamakta ve KF hastaları *P. aeruginosa* enfeksiyonundan ciddi olarak etkilenmektedir (Saiman, 2004).

KF’li hastalarda ilk izole edilen *P. aeruginosa* suşları nonmukoid koloni tipinde olup, pek çok antibiyotiğe duyarlıdır. Ancak zaman içinde *P. aeruginosa* suşları mukoid forma dönerler. Mukoid suşlar solunum yolunda, bir tür ekzopolisakkarit olan aljinattan zengin biyofilmler şeklinde yaşamaktadırlar. Biyofilm içinde üreme sayesinde *P. aeruginosa* hem antibiyotiklerin etkisinden hem de akciğerlerdeki immün

yanıttan korunabilmektedir. Bu durum mukoid kolonilerin eradikasyonunu zorlaştırır ve klinik seyrin daha hızlı bozulmasına neden olur. Bu nedenle *P. aeruginosa* ilk saptandıktan sonra mukoid koloniler oluşmadan etkin antibiyotik tedavisi ile ortadan kaldırılmalıdır (Döring ve ark., 2004).

1.5.1. Kistik Fibroziste Tanı

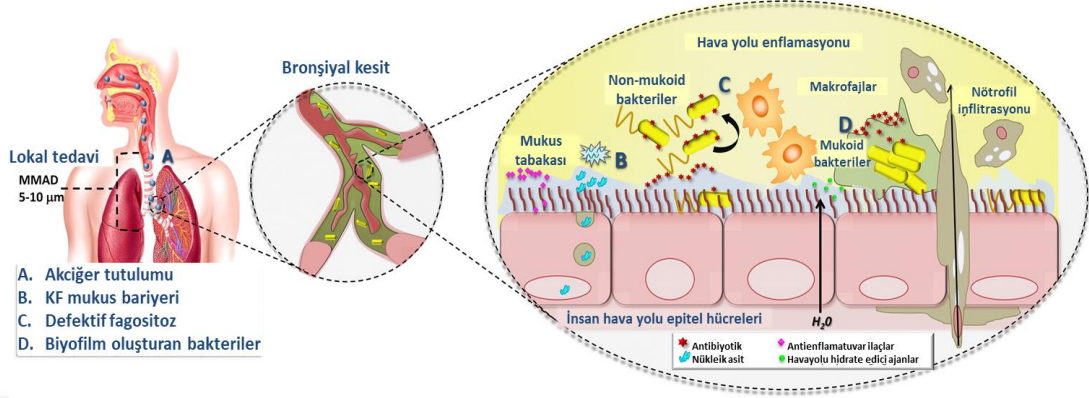
KF'in tipik (klasik) KF, atipik KF ve KFTR ilişkili hastalık olmak üzere üç fenotipi bulunmaktadır. KF fenotipinin tanısında ter testi altın standart olarak kabul edilmektedir. Bir veya daha fazla KF fenotipik özelliği taşıyan ve ter testi >60 mmol/L olan hastalar klasik (tipik) KF tanısı alırlar. Tipik klinik bulgular gösteren KF'li hastaların büyük bir kısmında ter testi tanı için yeterli iken atipik klinik bulguları olanlarda terdeki klor düzeyleri tanı koydurucu olmayabilmektedir. Bu hastalara tanı konulabilmesi için her iki KFTR geninde KF'e yol açan mutasyonun gösterilmesi gerekir. KFTR ilişkili hastalar ise KF tanısı konmayan ancak KFTR mutasyonu taşıma insidansı yüksek olan hastalardır. Bazı hastalıklarda ter testi yanlış pozitif çıkabilmekte ancak bunlar genellikle klinik bulgularıyla KF'ten ayırt edilebilmektedir. Özellikle ülkemizde KF mutasyonunun saptanamaması hastanın KF olmadığını göstermez (Türk Toraks Derneği Kistik Fibrozis Tanı ve Tedavi Rehberi, 2011).

1.5.2. KF'te Akciğer Hastalığı Tedavisi

KF'te morbiditenin ve mortalitenin en önemli nedeni akciğer tutulumu olduğu için, solunum sistemine yönelik tedaviler, KF'li hastaların tedavisinin temelini oluşturur.

KF'li hastalarda akciğer hastalığının tedavisi; fizyoterapinin, çeşitli mukolitik ajanların, inhaler tedavilerin, antibiyotiklerin ve anti-enflamatuvar ajanların kullanımını ve gerektiğinde non-invazif mekanik ventilasyon uygulamasını

içermektedir. Akciğer transplantasyonu da son dönem KF hastalarında uygulanan bir tedavi yöntemidir.



Şekil 1.8. KF’de inhale edilen ilaçların geçişini engelleyen anatomik ve biyolojik bariyerler. (D’Angelo ve ark.)

KF’te sık görülen enfeksiyonların tedavisi hastalıkta yaşam süresinin ve kalitesinin en önemli belirleyicisi olan akciğerlerdeki hasarın önlenmesinde temeli oluşturmaktadır. KF’li hastaların hayatta kalış sürelerinin gideşörek uzamasında antibiyotiklerin daha etkin olarak kullanılmasının büyük önemi vardır. Antibiyotik tedavisinde amaç, belirli bir mikroorganizma ile enfeksiyonu önlemek, enfeksiyonun erken evresinde mikroorganizmaları ortadan kaldırmak, akciğerde akut alevlenmeyi tedavi etmek ve hava yollarında kronik olarak bulunan mikroorganizmaların üremesini baskılamaktır (Türk Toraks Derneği Kistik Fibrozis Tanı ve Tedavi Rehberi, 2011).

KF’li hastalarda saptanan etken mikroorganizmaların solunum yollarında kalıcılığı söz konusu olabileceğinden, kronik kolonizasyonu önlemek için etken saptanır saptanmaz eradikasyonu sağlanmalıdır. Bu durum özellikle *P. aeruginosa* gibi kolonize olan mikroorganizmaların kronik kolonizasyon başlama sürelerinin geciktirilmesi açısından önemlidir.

P. aeruginosa’nın erken eradikasyon tedavisi için Danimarka’da 1989’da beri uygulanan ve “Kopenhag Protokolü” olarak bilinen tedavi yaklaşımında inhale kolistin ve oral siprofloksasin ile 3 basamaklı bir tedavi rejimi uygulanmıştır (Frederiksen ve

ark., 1997). Giderek dozun ve sürelerin artırıldığı bu rejim 1996 yılından itibaren tüm hastalarda 3. basamakta önerilen; 3 ay süre ile inhale kolistin (2 milyon ünite, 3 kez/gün) + oral siprofloksasin (10-20 mg/kg/gün, 2 doza bölünmüş) şeklinde uygulanmaktadır (Hoiby ve ark., 2005). Bu tedavi ile intermitan psödomonas üremesi olan KF'li hastalarda kronik P. aeruginosa kolonizasyonunun %80 oranında 15 yıla kadar önlenildiği gösterilmiştir (Hansen ve ark., 2008). İlk psödomonas kolonizasyonunda 3-4 hafta süre ile oral siprofloksasin (30-40 mg/kg/gün, 2 dozda) ve inhale tobramisin (2X300mg) veya sadece inhale tobramisin de uygulanabilmektedir. İlk psödomonas saptanmasında günde 2 kez 300 mg nebülize tobramisinin, 28 gün veya 56 gün boyunca uygulanmasının karşılaştırıldığı bir çalışmada elde edilen veriler her iki gruptaki hastaların sırasıyla %93 ve %92'sinde tedaviden bir ay sonra psödomonas saptanmadığını göstermiştir. Tedavi sonrası izlemde ise bu oran %66 ve %69 olarak bulunmuştur (Munck ve ark., 2001).

Erken eradikasyonda 2-3 hafta süre ile intravenöz betalaktam+aminoglikozid tedavisi ve bu tedaviden sonra 2-3 ay süre ile inhale tobramisin/kolistin ve/veya siprofloksasin tedavisi bir diğer tedavi yaklaşımıdır (Ratjen ve ark., 2010).

KF'te akut pulmoner alevlenme geçirme sıklığı hastalar arasında değişkenlik göstermektedir. Bununla birlikte, ağır akciğer bulguları olan hastaların daha çok akut pulmoner alevlenme geçirdikleri bilinmektedir. Akut pulmoner alevlenmede hastanın bulgularına göre oral, parenteral ve inhalasyon yolu ile antibiyotik kullanımı söz konusudur. Akut pulmoner alevlenme bulgusu taşıyan hastalarda tercih edilen antibiyotikler, dozları ve tedavi süreleri Çizelge 1.2 ve 1.3'de verilmiştir. Tedavi ile her zaman mikroorganizmayı eradike etmek mümkün olmayabilmektedir; ancak amaç hastanın klinik bulgularda ve solunum fonksiyon testlerinde düzelme sağlamaktır. Antibiyotiklerin yanı sıra göğüs fizyoterapisi ve mukolitik tedavi artırılarak gerekli olduğu durumlarda bronkodilatör tedaviler bu dönemde yardımcı olarak kullanılabilir (Türk Toraks Derneği Kistik Fibrozis Tanı ve Tedavi Rehberi, 2011).

Çizelge 1.2. KF’te etken bakteriye göre seçilecek antibiyotik tedavisi ve dozları.

Bakteri	Antibiyotik	Çocuk dozu (Günlük)	Erişkin dozu (Günlük)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sefazolin	120 mg/kg, 3 dozda IV	3 gr dozda IV
	Flukloksasilin*	100-200 mg/kg 3-4 dozda PO, IV	8-12 gr, 3-4 dozda PO, IV
	Nafsilin*	100-200 mg/kg 4 dozda, IV	8 gr, 4 dozda IV
	Fusidik asit	25-50 mg/kg 2-3 dozda PO	1.5-3gr / 3-4 dozda PO
	Klindamisin	20-40 mg/kg, 2-4 dozda PO, IV	1.2-2.4gr, 2-4 dozda PO, IV
MRSA	Vankomisin	40mg/kg 2-4 dozda IV	2 gr, 2-3 dozda IV
	Linezolid	10 mg/kg (5 yaş altında) 1200 mg, 2 dozda PO, IV	20 mg/kg 5 yaş üzerinde dozda PO, IV
<i>Haemophilus influenzae</i>	Amoksisilin	50-100 mg/kg, 3 dozda PO	1500 mg, 3 dozda PO
	Amoksisilin-klavulanik asit	50-100 mg/kg, 3 dozda PO	1500 mg, 3 dozda PO
	Sefuroksim aksetil	20-30 mg/kg, 2 dozda PO	1000 mg, 2 dozda PO
	Azitromisin	10 mg/kg, tek doz PO	500 mg, 1 dozda PO
	Klaritromisin	15 mg/kg, 2 doz PO,IV	1000 mg, 2 dozda PO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Seftazidim	150-200 mg/kg 3 dozda IV	6-9 gr, 4-6 dozda IV
	Piperasilin	400 mg/kg 4 dozda IV	12 gr, 4-6 dozda IV
	Imipenem	50-100 mg/kg 4 dozda IV	2-4 gr, 4 dozda IV
	Meropenem	60-120 mg/kg 3 dozda IV	3-6 gr, 3 dozda IV
	Aztreonam	150 mg/kg 3 dozda IV	6 gr, 3 dozda IV
	Tobramisin	10 mg/kg 1-3 dozda IV	9-12 mg/kg, 3 dozda IV
	Amikasin	20-30 mg/kg 3 dozda IV	15 mg/kg, 3 dozda IV
	Siprofloksasin	20-30 mg/kg 12 saatte bir PO, IV	800 mg, 2 dozda IV 1000-1500 mg, 2 dozda PO

*Ülkemizde bulunmamaktadır.

Çizelge 1.3. KF’te kullanılan inhale antibiyotikler ve günlük dozları.

Antibiyotik	Doz
Tobramisin	Koruyucusuz (TOBI®) 2X 300 mg IV formu 2X80-160mg Kronik kolonizasyon tedavisinde 1 ay verip, 1 ay ara verilerek yapılan 6 aylık Tedavi 1 kürdür
Gentamisin	IV formu <5 yaş, 2X40 mg 5-10 yaş, 2X 80mg >10 yaş, 2X160 mg
Kolistin	2-3 X 1-3 milyon Ünite 2 yaş < çocuklar için; 2X 500.000-1 milyon Ünite 2 yaş > çocuklar, erişkinler 2X1-2 milyon Ünite

KF’li hastaların akciğerlerindeki kronik *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Metisillin* dirençli *S. aureus* (MRSA) kolonizasyonlarının erken ve yoğun antibiyotik tedavisi ile akciğer hasarının azaldığı ve yaşam süresinin arttığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Gibson ve ark., 2003).

Son altı ay içinde art arda alınan ve aralarında en az bir ay süre bulunan üç kültürde *P. aeruginosa* üremesi olarak tanımlanan kronik *P. aeruginosa* kolonizasyonu, KF’li bebeklerde %15-20, çocuklarda %30-40, adolesanlarda %60, yetişkinlerde %80 oranında gelişmektedir. *P. aeruginosa* ile kronik enfeksiyon pulmoner fonksiyonları ve klinik gidişi kötüleştirmektedir (Sadikot ve ark., 2005).

KF’te kronik *P. aeruginosa* kolonizasyonunda kronik enfeksiyonun supresyonu için aerosolize antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu amaçla, inhalasyon yoluyla tobramisin inhalasyon çözeltisi ve kolistin kullanılmaktadır. Bu ilaçların kullanımının klinik kötüleşme hızını yavaşlattığı, hastaneye müracatı ve yatışı azalttığı, klinik skoru ve vücut ağırlığı profilini düzelttiği bildirilmiştir. Tobramisin inhalasyon çözeltisi *P. aeruginosa* ile kronik kolonize olan hastalarda 12 saat arayla 300 mg dozda, nebülizer

ile uygulanmaktadır. Bu tedavi 28 gün boyunca uygulanmakta, ardından 28 gün ilaç kullanılmamakta ve daha sonra bu şekilde tekrar edilmektedir (Moss, 2002).

Kolistinin, 1 ay-2 yaş arasındaki hastalarda 500,000-1 milyon ünite 12 saatte bir, 2 yaş üstündeki hastalarda ise 1-2 milyon ünite 12 saatte bir nebulizasyon yoluyla uygulanması önerilmektedir. Bronkospazm riski olduğu için ilacın ilk dozları hastanede verilmeli, öncesinde ve sonrasında solunum fonksiyon testleri yapılmalıdır.

Kronik *P. aeruginosa* kolonizasyonunda bir diğer tedavi yöntemi ise makrolit grubu antibiyotiklerin kullanımıdır. Makrolitlerin KF'li hastalarda immün yanıtı düzenlediği gösterilmiştir. Makrolit antibiyotiklerin *P. aeruginosa*'ya karşı bakterisidal ve bakteriyostatik özelliği bulunmayıp antienflamatuvar ve hücreler arası iletişimi kısıtlayarak mikroorganizmanın patojenitesini ve biyofilm oluşumunu sınırlamaktadırlar.

P. aeruginosa ile kronik kolonize olan hastalarda solunum fonksiyonlarını düzeltmek ve akut pulmoner alevlenmeleri azaltmak amacıyla ya da enfeksiyon durumundan bağımsız olarak konvansiyonel tedaviye cevap vermeyen tüm KF'li hastalarda oral makrolit tedavisi olarak 6 ay süre ile azitromisin uygulanabilmektedir.

Kronik *S. aureus* kolonizasyonu ile ilgili olarak uzun süreli antibiyotik tedavisi denenmiştir. Ancak, *P. aeruginosa* ortaya çıkma hızını artırdığı için rutin olarak kullanılması önerilmemektedir.

Metisilin dirençli S. aureus (MRSA) kronik kolonizasyonu KF'li hastaların yaşam süresini azaltan sorunlardan birisidir. Yapılan bir çalışmada, yetişkin kronik *MRSA* kolonizasyonu olan hastalarda 50 kg'ın altına 450 mg, 50 kg'ın üstüne 600mg/gün rifampisin ve 250-500 mg sodyum fusidat 6 ay süreyle verildiğinde tedavi sonrası 6 ayda *MRSA* üremediği gösterilmiştir (Türk Toraks Derneği Kistik Fibrozis Tanı ve Tedavi Rehberi, 2011).

1.5.3. KF'te Antibiyotik Direnci

P. aeruginosa enfeksiyonlarının tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi bakterinin mevcut antibiyotiklerin pek çoğuna direnç geliştirmesidir. Ayrıca, tedavi sırasında yüksek dozda antibiyotik kullanımı çoklu ilaç direncine sahip *P. aeruginosa* suşlarının oluşmasına ve bu nedenle bu mikroorganizmaya karşı uygulanan antibiyotik tedavisinin etkisiz kalmasına neden olmaktadır (Lister ve ark., 2009).

P. aeruginosa başta aminoglikozitler, kinolonlar ve β -laktamlar olmak üzere pek çok antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir. *P. aeruginosa*'nın kullandığı temel direnç mekanizmaları intrinsik, edinilmiş ve adaptif dirençtir. İntrinsik direnç mekanizmaları dış membran geçirgenliğinin azalması, antibiyotiğin hücre dışına atılmasına neden olan eflux pompalarının ekspresyonu ve antibiyotiği inaktive eden enzimlerin üretimidir. Edinilmiş direnç, direnç genlerinin transferi veya mutasyonel değişikliği ile gelişebilmektedir. Adaptif direnç ise enfekte hastaların akciğerlerinde biyofilm oluşumu ve buna bağlı olarak bakteriyel hücreye antibiyotik girişinin engellenmesi ile gelişmektedir. Ayrıca, çoklu ilaç direncine sahip bakteriler KF'li hastalarda uzun süreli ve tekrarlayan enfeksiyonlardan sorumludur (Hancock ve ark., 2000).

Klasik antibiyotiklere direnç gösteren hastalarda *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi için yeni antibiyotiklerin veya alternatif tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Son yıllarda, yeni etki yoluna sahip antibiyotikler ve yeni uygulama yolları araştırılmıştır. Geliştirilmiş olan antibiyotikler *P. aeruginosa*'ya karşı mükemmel in vitro antibakteriyel aktivite ve klasik antibiyotiklere kıyasla daha düşük minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) göstermektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalar antibiyotiğe dirençli *P. aeruginosa* suşlarının öldürülmesinde oldukça etkili olan birkaç yeni terapötik yaklaşım bildirmiştir. Bu yaklaşımlar; algılama ve bakteriyel lektinlerin inhibisyonu, demir şelasyonunun kullanımı, faj tedavisi, aşı stratejisi, nanopartiküller, antimikrobiyal peptitler ve elektrokimyasal iskelelerin kullanımını içermektedir. Bu yeni terapötik

yaklaşımlar, klasik antibiyotik tedavilerine alternatif olarak veya bunlarla kombine halinde kullanılabilir (Pang ve ark., 2019).

1.6. Antimikrobiyal Peptitler

Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), vücudun patojenlere karşı doğal savunma mekanizmasının temel bileşenlerindendir. İnsanlarda granülositler, makrofajlar ve çoğu epitel hücre tarafından üretilirler ve antimikrobiyal, antifungal, antiviral ve hatta antiprotozoal aktiviteye sahiptirler. AMP'ler, güçlü bakterisidal özelliklere sahip yeni antibiyotikler olarak, antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı kullanılmıştır. Antimikrobiyal Peptit Veri Tabanı (APD)'na göre 2300'den fazla AMP izole edilmiştir. Ayrıca çok sayıda AMP sentetik olarak üretilmiştir (Seo ve ark., 2012).

AMP'ler bakteri, mantar, protozoa, zarflı virüsler ve hatta kanser hücreleri olmak üzere pek çok organizmaya karşı etki etmektedir. Ayrıca AMP'ler, adaptif immün regülasyon ve enflamatuvar yanıtta gerekli olan immünomodülatör aktiviteye sahiptir. Son on yılda, AMP'ler, özellikle ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için, yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin yanı sıra, ikincil bir tedavi olarak geniş çapta incelenmektedir (Moghaddam ve ark., 2015).

AMP'lerin biyolojik aktivitesi genellikle hücre zarlarındaki fosfolipitlerle olan etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır. AMP'ler protein sentezi, nükleik asit sentezi, enzim aktivitesi ve hücre duvarı sentezi gibi bazı hücre içi reaksiyonları inhibe ederler. 100'den fazla amino aside sahip büyük AMP'ler genellikle litik enzimler, besin bağlayıcı proteinler veya spesifik mikrobiyal makromolekülleri hedefleyen bölgeler içeren peptitlerken, küçük AMP'ler esas olarak mikrobiyal hücre zarlarının yapısını veya işlevini bozarak veya ATP ile etkileşime girip ATP'ye bağımlı enzimlerin etkisini doğrudan inhibe ederek etki gösterirler (Moghaddam ve ark., 2014).

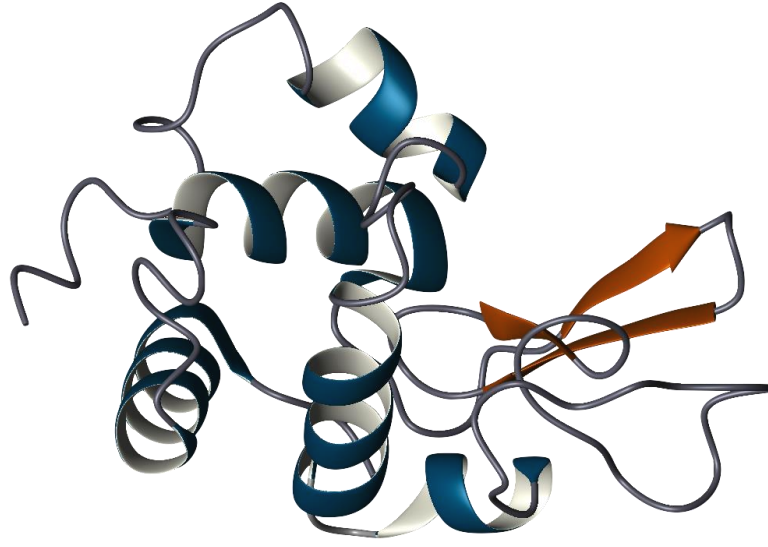
AMP'lerin genel yapısal özellikleri, etki şekillerini belirlemektedir. Örneğin, AMP'lerin sahip olduğu pozitif yükler elektrostatik etkileşimlere ve ayrıca bakteri

hücresinin polianyonik yüzeyinde birikmesine neden olurken, amfipatik özellikleri hücre zarının hidrofobik bölgesine nüfuz etmelerini sağlar (Shai, 2002).

Bakterilerde, sitoplazmik membrana ulaşmadan önce AMP'lerin bakteriyel zarfı geçmesi gerekir. Antimikrobiyal aktivite, doğrudan hücrelerin ölümüne yol açan katyonik ve amfipatik özelliklerine bağlı olarak peptitlerin biyolojik membranlara zarar verme kapasitesinin bir sonucu olarak gerçekleşmektedir. Çalışmalar, konakçı savunmasında önemli bir rol oynayan AMP'lerin en önemli grubu olan katyonik peptitlerin, alım yollarını kendileri iyileştirerek dış membrandan geçtiklerini göstermiştir. Bu yolla, magnezyum (Mg^{+2}) ve kalsiyum (Ca^{+2}) gibi iki değerlikli katyonlar bitişik lipopolisakarit (LPS) molekülleri arasında stabilize edici köprüler oluşturarak katyonik peptitler ile yer değiştirir. Gram negatif bakterilerde dış membranın ana kısmı olan LPS'nin stabilizasyonu, bu pozitif yüklü katyonlar tarafından sağlandığı ve bu ajanlarla karşılaştırıldığında katyonik peptitlerin LPS'ye daha fazla eğilimi olduğu için, bakteri hücresine maruz kalma sırasında bu peptitlerin Mg^{+2} ve Ca^{+2} ile yer değiştirmesi dış membranda lokal bozulmaya neden olur. Bu prosesi takiben sitoplazmik membranın bozulması bakteri ölümüyle sonuçlanır. Çalışmalar, bakteri ölümünün spesifik bir reseptöre bağlı olmadığını ve hücre membranındaki çifte tabakanın bozulması ile gerçekleştiğini göstermiştir (Moghaddam ve ark., 2015).

1.7. Lizozim

Lizozim 14.4 kDa molekül ağırlığına sahip 129 aminoasitten oluşan bir proteindir. Lizozim, virüsler ve bütün canlı organizmaların dokularından, salgılarından ve hücrelerinden saflaştırılarak elde edilen hidrolitik bir enzimdir. Lizozim, ilk kez 1922'de Alexander Fleming tarafından burun salgısında tesadüfen keşfedilmiştir (Wang, 2014). Lizozim yapısında 10 karboksil ve 7 amino grubu, 11 arjinin kalıntısı, 6 triptofan kalıntısı ve 4 disülfid bağı içermektedir. Lizozimin yapısı birinde ağırlıklı olarak α -heliks yapıları, diğerinde ise β -tabakaları içeren iki kısımdan oluşur. Lizozimin üç boyutlu yapısı Şekil 1.9'da verilmiştir.



Şekil 1.9. Lizozimin üç boyutlu yapısının şematik gösterimi. <http://www.bmrb.wisc.edu/featuredSys/Lysozyme/>

Mukopolisakkarit yapısında olan ve müramidaz olarak da bilinen lizozimin; insan gözyaşı, ter, burun salgısı, gastrointestinal kanal duvarındaki pek çok salgıda ve dişeti oluşu sıvısında bulunduğu gösterilmiştir (İbrahim ve ark., 2002).

Lizozimin 3 temel fonksiyonu vardır. Bunlardan ilki Gram pozitif bakterilerde bakteriyel hücre peptidoglikanlarını ve polisakkaritleri parçalayan direkt enzimatik etkisidir. Ayrıca, peptidoglikanın muramidilpeptide ayrılıp immün yanıtın oluşması ile indirekt bir enzimatik etki görülmektedir. Son olarak, pozitif yüklü lizozim bakteriyel hücre membranlarındaki negatif yüklü grupları nötralize etmektedir (Grumezescu ve ark., 2017).

Lizozimin nötrofil granülositleri, monositler, makrofajlar ve yaşayan organizmaların pek çok biyolojik sıvı ve dokularında olması, onu organizmaların spesifik olmayan savunma mekanizmalarının önemli bir parçası yapmaktadır (İbrahim ve ark., 2002).

Doğal lizozim substratı, sadece prokaryot hücrelerinde bulunan, bir ağ gibi hücreyi çevreleyen ve çözünmeyen devasa bir molekül olan peptidoglikandır.

Peptidoglikanın yapısı N-asetilglukozamin (NAG), N-asetilmuramik asit (NAM) ve bazı D-amino asitleri içeren bir tetrapeptitten oluşmaktadır. Peptidoglikan tabakasındaki NAG ve NAM arasındaki β -1,4 glikozidik bağların degradasyonu, lizozimin duyarlı bakterileri öldürme mekanizmalarından biridir (İbrahim ve ark., 2002). Yakın bir zamana kadar lizozimin, sadece Gram pozitif bakterilere karşı etkili bir bakterisidal ajan olduğu düşünülmüştür. Gram negatif bakteriler ise peptidoglikan tabakasını çevreleyen bir dış membrana sahip oldukları için lizozim tarafından doğrudan parçalanamazlar. Bu nedenle, Gram negatif bakteriler dış mebranlarının geçirgenliği değişime uğradığında lizozim tarafından parçalanır ve lizozim muramidaz olarak etki göstereceği peptidoglikan tabakaya ulaşır. Bu engelin üstesinden gelebilmek için uygulanabilecek bir strateji lizozimi hidrofobik bir taşıyıcı ile uygulayarak membran ile etkileşimini ve membranın içine yerleşmesini sağlamaktır. Bu strateji lizozimin etki bölgesi olan peptidoglikan tabakasına ulaşmasını sağlamaktadır (İbrahim ve ark., 2002).

Muramidaz aktivitesine ek olarak, lizozimin katyonik bir protein olma özelliği bakterilerin otolizini aktive ederek hücre duvarlarının parçalanmasına neden olmaktadır. Bu katyonik özelliğinden dolayı, sıcaklıkla inaktif olsa bile, bakterisidal etkilerini hala sürdürebilmektedir. Bu etki iki basamakta gerçekleşmekte olup hücre duvarının enzimatik olarak parçalanmasından sonra, hücre zarının fiziksel-kimyasal düzensizliği sonucunda bakterinin ölümü gerçekleşmektedir (İbrahim ve ark., 2002).

Lizozimin Gram negatif bakteriler üzerinde de öldürücü etkiye sahip olduğu ancak bu etkinin parçalanmadan kaynaklanmadığı görülmüştür (Wild ve ark., 1997). Bu sonuçlar, E.coli üzerinde yapılan araştırmalar ile doğrulanmıştır (Pellegrini, 2000).

Bhavsar ve arkadaşları (2010) aerolize rekombinant insan lizoziminin P. aeruginosa kaynaklı pnömoniye karşı etkili olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmada, lizozim akciğer parankiminde ve solunum yollarında P. aeruginosa kolonizasyonunda önemli derecede azalma sağlamıştır. Bu sonuçlar, aerosolize lizozimin P. aeruginosa kaynaklı pnömoninin tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliğini artırabileceğini düşündürmüştür. Bu amaçla, Bhavsar ve arkadaşları yaptıkları diğer

bir çalışmada (2011), lizozimi tobramisin ile birlikte uygulamış ve lizozimin tobramisinin etkin dozunda azalma sağladığını belirlemiştir.

Lizozimin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bilinmekle birlikte stabilitesinin zayıf olması ve kolay inaktivasyonu pratikte kullanımını oldukça sınırlandırmaktadır. Wu ve arkadaşları (2018), lizozimin stabilitesini artırarak antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmek amacıyla lizozimi kitozan/sodyum aljinat hidrojellerine yüklemişlerdir. Kitozanın hücre membranından geçerek DNA molekülüne adsorbe olup RNA transkripsiyonunu bloke edici etkisi ile lizozimin antibakteriyel etkisinin kombinasyonu sonucunda %100 bakteriyel klirens oranı elde edilmiştir (Wu ve ark., 2018).

Bu çalışmanın amacı, inhalasyon yolu ile uygulanmak üzere KF'deki enfeksiyon etkenlerine karşı etkili lizozim içeren mikropartikler sistemler geliştirmek ve değerlendirmektir. Antimikrobiyal etkili bir protein olan lizozim, klasik antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan Madde	Marka
Akrilamit	Sigma, Almanya
Amonyum persülfat	Sigma, Almanya
Bakır-II sülfat pentahidrat	Riedel-de Haën, Almanya
Bikininik asit (BCA)	Thermo Scientific, ABD
Bisakrilamit	Sigma, Almanya
Brom fenol mavisi	Merck, Almanya
Coomassie brilliant blue G-250	Bio-Rad, ABD
Diklorometan	Sigma-Aldrich, Almanya
Glasiyal asetik asit	Merck, Almanya
Gliserol	Riedel-de Haën, Almanya
Glisin	Sigma, Almanya
Lizozim	Aventis,
Molekül ağırlığı belirteci (10-220 kDa)	Invitrogen, ABD
N,N,N',N'-tetrametil-etilen diamin (TEMED)	Sigma, Almanya
Polikaprolakton (PCL)	Sigma-Aldrich, Almanya
Polivinilalkol (PVA)	Sigma-Aldrich, Almanya
Sert jelatin kapsül (No:4)	Capsugel, Belçika
Sodyum azit	Merck, Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma, Almanya
Sodyum karbonat	Merck, Almanya
Sodyum tartarat dihidrat	Sigma, Almanya

2.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Kullanılan Alet ve Malzeme	Marka
Andersen cihazı	Copley Scientific, İngiltere
Buzdolabı	Vestel, Türkiye
Cam malzeme	İldam, Türkiye
Çalkalamalı inkübatör	Jeio Tech, Kore
Derin dondurucu	Heto, Almanya
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Shimadzu DSC-60, Japonya
Elektroforetik jel sistemi	Thermo Scientific, ABD
Etüv	Heraus, Almanya
Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi (FTIR)	Agilent, Amerika
Hassas terazi	Sartorius, Almanya
Homojenizatör	T25 Basic Ika® Labortechnik, Almanya
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC, Kanada
Manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific, Kore
Mikropipet (1-10 µl)	Eppendorf, Almanya
Mikropipet (10-100 µl)	Eppendorf, Almanya
Mikropipet (100-1000 µl)	Eppendorf, Almanya
Mikropipet ucu	Eppendorf, Almanya
Mikroplaka (96 kuyucuklu)	Carl-Roth, Almanya
Mikroplaka okuyucusu	MDS Spektra Max 190, ABD
pH metre	Mettler Toledo Seven2go, İsviçre
Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı	Malvern Mastersizer 3000, İngiltere
Santrifüj	Sigma 2-16P, Almanya
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	FEI Quanta 200 FEG SEM, Japonya
Vorteks karıştırıcı	Heidolph Reax Top, Almanya

2.3. Çalışmalarda Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

pH 7.4 Fosfat Tamponu (EP 7)

0,2 M KH_2PO_4 çözeltisi.....	250 ml
0,2 M NaOH çözeltisi.....	195,5 ml
SDS.....	%0.01
Sodyum azit.....	%0,02
Distile su.....y.m.....	1000 ml

Yükleme Jel Çözeltisi

Akrilamid-N,N metilen bisakrilamid çözeltisi.....	0,33 ml
1 M (pH 6,8) tris tamponu.....	0,25 ml
%10 amonyum persülfat çözeltisi.....	20 μL
TEMED.....	2 μL
Distile su.....	1,4 ml

Elektroforez Tamponu

Tris.....	3,2 g
Glisin.....	18,8 g
Distile su.....y.m.....	1000 ml

Örnek Yükleme Tamponu

1 M Tris çözeltisi (pH 6,8).....	2,5 ml
Gliserol.....	2 ml
% 1'lik Bromfenol mavisi.....	1 ml
Distile su.....	4,5 ml

Jel Boyama Çözeltisi

Coomassie mavisi.....	0,25g
Metanol.....	45 ml
Glasiyal asetik asit.....	10 ml
Distile su.....y.m.....	100 ml

2.4. Yöntemler

2.4.1. Mikrobikinoninik Asit (MikroBCA) Analiz Yöntemi Kullanılarak

Etkin Maddenin Standart Doğru Denkleminin Hazırlanması

Gerekli reajanlar:

Reajan A

Sodyum karbonat.....	8 g
Sodyum tartarat.....	1,6 g
Distile su.....ym.....	100 ml

Reajan B

BCA'nın % 4'lük sulu çözeltisi

Reajan C

Bakır-II sülfat pentahidratın % 4'lük sulu çözeltisi

Lizozimin mikroBCA ile analizi için stok çözeltiler distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu ile 100 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden hareketle belli seyreltmeler yapılarak 4 – 48 µg/ml aralığında 7 farklı konsantrasyonda çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan bu çözeltilerden 3 paralel olacak şekilde mikrolaktaki kuyucuklara 150’şer µl ilave edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa 150 µl reajan A, reajan B ve reajan C karışımından oluşan mikroBCA ajanı (25 kısım reajan A + 24 kısım reajan B ve 1 kısım reajan C) ilave edilmiş ve mikrolaka 60 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaka önce oda sıcaklığına soğutulmuş, daha sonra mikrolaka okuyucusunda 562 nm’de seyreltmelerin absorbansı ölçülmüştür. Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri en küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip standart doğru denklemleri hesaplanmıştır.

2.4.2. MikroBCA Analiz Yönteminin Validasyonu

Lizozimin mikroBCA analiz yöntemi ile gerçekleştirilen miktar tayininin validasyonunda ICH Q2 (R1) kılavuzunda yer alan parametreler incelenmiştir.

2.4.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

Doğrusallık, verilen aralıklarda, örnekteki madde konsantrasyonu ile test sonuçlarının doğru orantılı sonuçlar sağlayabilmesidir. Doğrusallığın saptanmasında en az 5 konsantrasyon gereklidir. Eğer doğrusal bir ilişki mevcutsa, analiz sonuçları, en küçük kareler yöntemiyle regresyon doğrusunun hesaplanması gibi uygun istatistiksel metodlarla değerlendirilebilmektedir. Korelasyon katsayısı, kesişim, regresyon doğrusunun eğimi ve artık kareler toplamı hesaplanmalıdır (ICH Q2 (R1)).

Lizozimin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 100 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmış stok çözeltilerinden seyreltmeler yapılarak her bir ortam için 4 – 48 µg/ml konsantrasyon aralığında 7 farklı konsantrasyonda çözelti elde

edilmiştir. Bu çözeltilerin mikroBCA yöntemi ile okunan absorbands değerleri Graphpad Instat istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.4.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Kullanılacak yöntemle elde edilen sonuçların gerçek verilere yakınlığı, o analitik yöntemin doğruluğudur. Gerçeklik olarak da adlandırılır. Analiz edilen maddenin bilinen miktar tayini yöntemi ile % geri elde değerleri bulunarak hesaplanır. Doğruluk, belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numune miktarlarının yüzde geri eldelerinin belirlenmesiyle tayin edilmektedir (ICH Q2 (R1)).

2.4.2.3. Kesinlik

Bir analitik işlemin kesinliği, aynı örnekten alınan numuneler için birbirini takip eden ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığı anlamına gelmektedir. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik ile açıklanır (ICH Q2 (R1)).

Ara kesinlik

Ara kesinlik laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik parametresidir. Farklı günlerde, farklı analistler ve farklı cihazlar kullanılarak saptanan kesinliktir. Deneyler arası veya günler arası kesinlik olarak da adlandırılır.

Lizozimin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki miktar tayini yönteminin ara kesinliğini belirlemek için 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 8 µg/ml, 24 µg/ml ve 40 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbands değerleri, iki farklı günde 6 kez okunarak kalibrasyon denkleminde yerine konulmuştur. Bulunan konsantrasyonların ortalama, SS ve % BSS değerleri hesaplanmıştır.

2.4.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Bir analitik yöntemin teşhis sınırı, analizi yapılan etkin maddenin teşhis edilebilen ama tayin edilemeyen en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (ICH Q2 (R1)).

Lizozimin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin teşhis sınırını belirlemek amacıyla, 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 7 farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve 3 paralel olacak şekilde ölçümleri yapılarak, konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinin ortalama ve SS değerleri bulunduğundan sonra aşağıdaki denklem kullanılarak teşhis sınırları hesaplanmıştır.

$$LOD = 3,3 \sigma/s$$

σ : Regresyon doğrularının kesişim değerlerinin SS'ı

s : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Bir analitik yöntemin tayin sınırı, analizi yapılan etkin maddenin kabul edilebilir aralıktaki doğruluk ve kesinlikte, kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük miktarıdır (ICH Q2 (R1)).

Lizozimin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin tayin sınırını belirlemek amacıyla, 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 7 farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve 3 paralel olacak şekilde ölçümleri yapılarak, konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinin ortalama ve SS değerleri bulunduğundan sonra aşağıdaki denklem kullanılarak tayin sınırları hesaplanmıştır.

$$LOQ = 10 \sigma/s$$

σ : Regresyon doğrularının kesişim değerlerinin SS'ı

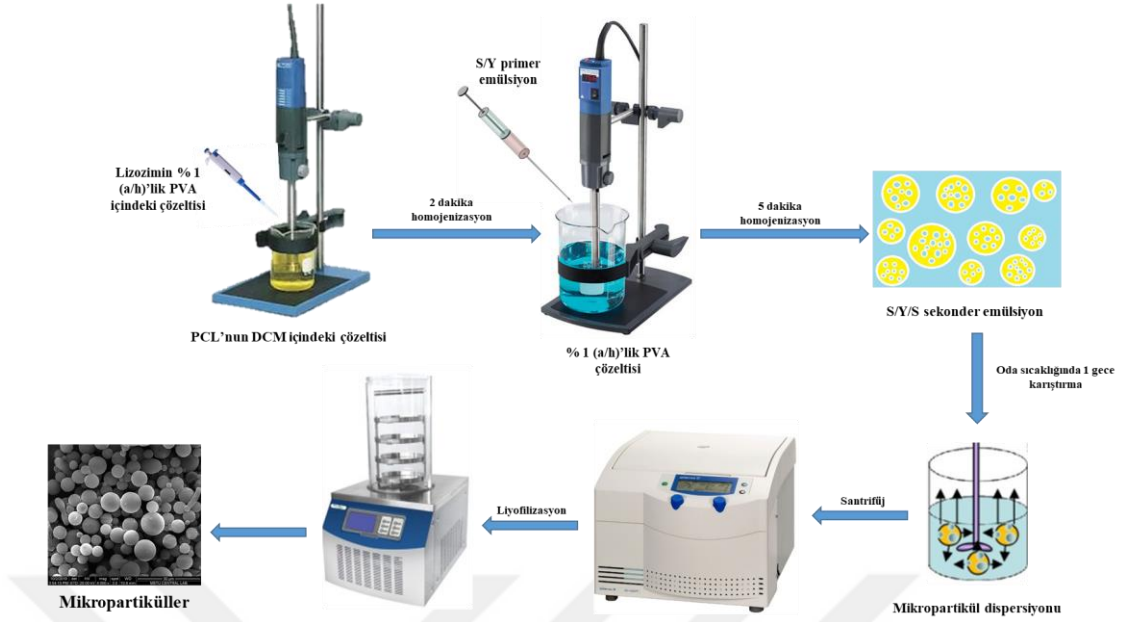
s : Kalibrasyon eğrisinin eğimi

2.4.2.5. Seçicilik

İn vitro deneylerde lizozimin miktar tayini yapılırken mikropartikül formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin lizozimin mikroBCA ile analizinde girişim yapıp yapmadığını belirlemek için her bir yardımcı madde için mikroBCA analizi yapılarak absorbands verip vermedikleri kontrol edilmiştir.

2.4.3. Mikropartiküllerin Hazırlanması

Lizozim içeren mikropartiküller, su içinde-yağ içinde-su (s/y/s) emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. %1'lik (a/h) polivinil alkol (PVA) çözeltisi hazırlanmış ve lizozim bu çözeltide çözülmüştür. 200 mg polikaprolakton (PCL) ise diklorometanda (DCM) çözülmüştür. Lizozimin %1'lik (a/h) PVA içindeki çözeltisi PCL'un DCM çözeltisine enjektör yardımı ile ilave edilip 13500 rpm'de 2 dakika boyunca homojenize edilerek primer emülsiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan primer emülsiyon farklı hacimlerdeki %1'lik PVA çözeltisine eklenmiş ve 13500 rpm'de 5 dakika boyunca karıştırılarak sekonder emülsiyon hazırlanmıştır. Bu emülsiyon oda sıcaklığında ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) 1 gece boyunca karıştırılarak DCM'in tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen mikropartikül süspansiyonu 4500 rpm'de 30 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Ayrılan mikropartiküller daha sonra distile su ile yıkanıp -40°C 'de dondurularak 48 saat süreyle liyofilize edilmiştir. Mikropartiküllerin hazırlanışı Şekil 2.1'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Mikropartikül hazırlanışının şematik olarak gösterimi.

2.4.4. Çalışılan Mikropartikül Formülasyonları

Mikropartikül formülasyonlarının s/y/s emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanması için ilk olarak dış sulu fazda kullanılacak surfaktan tipi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla Pluronic F68, Tween 60 ve %1'lik PVA çözeltisi kullanılarak ön çalışmalar yapılmıştır.

Çalışmamızda hazırlanacak mikropartikül formülasyonlarının belirlenmesi için 2^4 full faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Kullanılan deney tasarımında bağımsız değişkenler olarak lizozim miktarı (mg), DCM hacmi (ml), PVA hacmi (ml) ve homojenizasyon hızı (rpm) seçilmiştir. Bağımsız değişken seviyeleri ise düşük ve yüksek olarak belirlenmiştir.

2.4.5.1. Mikropartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi

Hazırlanan tüm mikropartikül formülasyonlarında partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı ölçümleri lazer kırınımı yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimer (PCL) suda çözünmediği için, ölçümlerde kullanılacak örnekler mikropartiküllerin ultra saf su içinde süspande edilmesi ile hazırlanmıştır. Ölçümler Malvern Mastersizer 3000 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Her bir mikropartikül formülasyonu için ölçümler 6 kez tekrarlanmış ve elde edilen değerlerden hareketle ortalama partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımının göstergesi olarak span değerleri Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Span = \frac{D_{\%90} - D_{\%10}}{D_{\%50}}$$

Eşitlik 2

$D_{\%10}$ = Mikropartiküllerin %10 kümülatif hacim yüzde değeri

$D_{\%50}$ = Mikropartiküllerin %50 kümülatif hacim yüzde değeri

$D_{\%90}$ = Mikropartiküllerin %90 kümülatif hacim yüzde değeri

2.4.5.2. Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi Tayini

Mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği değerleri indirekt yöntem ile belirlenmiştir (Liu ve ark., 2016). Bu amaçla öncelikle mikropartiküllere yüklenmemiş olan lizozim miktarı hesaplanmıştır. Mikropartiküllerin hazırlanma işlemi sırasında, mikropartikül dispersiyonunun santrifüj edilmesi ile ayrılan süpernetandaki lizozim miktarı mikroBCA yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu amaçla lizozimin distile sudaki kalibrasyon denklemi kullanılmıştır. Böylelikle mikropartiküllere yüklenmemiş olan lizozim miktarı belirlenmiştir. Süpernetandaki lizozim miktarının başlangıçta kullanılan lizozim miktarından çıkarılması ile mikropartiküllere yüklenen lizozim

miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra aşağıdaki formüller kullanılarak mikropartiküllerde enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi tayin edilmiştir.

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği(\%)} = \frac{\text{Mikropartiküllere yüklenen lizozim miktarı}}{\text{Formülasyona eklenen toplam lizozim miktarı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 3}$$

$$\text{İlaç Yükleme Kapasitesi (\%)} = \frac{\text{Mikropartiküllere yüklenen lizozim miktarı}}{\text{Formülasyona eklenen toplam madde miktarı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 4}$$

2.4.5.3. Üretim Verimi Tayini

Üretim verimi, üretim tamamlandıktan sonra elde edilen mikropartikül miktarının üretim sırasında kullanılan toplam katı madde miktarına oranlanması ile hesaplanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ Üretim Verimi} = \frac{\text{Üretilen mikropartikül miktarı}}{\text{Üretim sırasında kullanılan toplam katı madde miktarı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 5}$$

2.4.6. Optimum Mikropartikül Formülasyonunun Belirlenmesi

Çalışmamızda lizozim içeren mikropartikül formülasyonları 2⁴ full faktöriyel deney tasarımı kullanılarak hazırlandıktan sonra elde edilen mikropartikül formülasyonlarına ait ortalama partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği değerlerinden hareketle Minitab 17 istatistik programı kullanılarak optimum mikropartikül formülasyonu için gerekli bağımsız değişken seviyeleri belirlenmiştir. Bu parametrelere uygun olarak hazırlanan mikropartiküllerde aşağıda belirtilen in vitro karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

2.4.7. Optimum Mikropartikül Formülasyonunun Karakterizasyonu

2.4.7.1. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi

Optimum mikropartikül formülasyonuna ait ortalama partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı Bölüm 2.2.5.1’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.4.7.2. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Yüzey Yükünün Belirlenmesi

Optimum mikropartikül formülasyonunun yüzey yükünün belirlenmesi için zeta potansiyeli ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ölçümler Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve her bir örnek için 3 kez tekrarlanmıştır.

2.4.7.3. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Optimum mikropartikül formülasyonuna ait enkapsülasyon etkinliği değeri Bölüm 2.2.5.2’de belirtildiği şekilde belirlenmiştir.

2.4.7.4. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Üretim Veriminin Belirlenmesi

Optimum mikropartikül formülasyonuna ait üretim verimi değeri Bölüm 2.2.5.3’de belirtildiği şekilde belirlenmiştir.

2.4.7.5. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) Analizi

Lizozimin, PCL'un ve lizozim içeren mikropartiküllerin FTIR spektroskopisi ile tanımlanması için Agilent FTIR cihazı kullanılmıştır. Cihaza toz halinde yerleştirilen örneklerin 4000 - 650 cm^{-1} dalga boyları arasındaki spektrumları alınmıştır.

2.4.7.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Lizozimin, PCL'un ve lizozim içeren mikropartiküllerin termal özellikleri Shimadzu DSC-60 cihazı ile incelenmiştir. 3-5 mg ağırlığındaki örnekler alüminyum pana yerleştirilerek sıkıştırılmıştır. Azot gazı 50 ml/dakika akış hızında kullanılarak, örnekler 30-350°C sıcaklık aralığında 5°C/dakika lineer ısıtma hızında analiz edilmiştir. Boş pan kör olarak kullanılmıştır.

2.4.7.7. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Optimum mikropartikül formülasyonunun morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Lizozim yüklü mikropartiküller alüminyum parça üzerine oturtulmuş karbon adhezif disk üzerine püskürtülmüş ve örneklerin üzeri ince bir tabaka altın ile kaplandıktan sonra 20°C ve 10^{-5} Torr vakum ile fotoğrafları çekilmiştir. Görüntüleme FEI Quanta 200 FEG SEM ile gerçekleştirilmiştir.

2.4.7.8. Çözünme Hızı Tayini

Mikropartiküllerin in vitro salım profilleri diyaliz yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Han ve ark., 2012; Alibolandi ve ark., 2016). Bu amaçla belirli miktarda lizozim içeren mikropartiküller lizozimin molekül ağırlığına uygun bir diyaliz membran (Cut-off 100 kDa) içinde çözünme hızı ortamına yerleştirilmiştir. Çözünme ortamı olarak 50 ml % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 7,4 fosfat tamponu kullanılmıştır.

Çalkalamalı inkübatörde $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ ve 100 rpm’de karışmakta olan çözünme ortamlarından belirlenen zaman aralıklarında 0,5 ml örnek alınarak aynı miktarda taze ortam ilave edilmiştir. Alınan örneklerdeki lizozim miktarı mikroBCA yöntemi ile belirlenmiştir. Deneyler 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş, elde edilen % açığa çıkan lizozim miktarlarının zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile in vitro salım profilleri elde edilmiştir.

2.4.7.9. Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirilmesi

Optimum formüle ait, diyaliz yöntemi ile elde edilen çözünme hızı verileri SPSS 20 bilgisayar programı kullanılarak sıfır derece, birinci derece, Hixson-Crowell, Higuchi ($Q \sqrt{t}$), Weibull ve Peppas-Korsmeyer kinetikleri ile incelenmiştir. Hesaplanan r^2 ve artık kareler ortalaması (AKO) değerleri karşılaştırılarak sonuçları en iyi ifade eden kinetik tespit edilmeye çalışılmıştır.

2.4.7.10. Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Mikropartiküllerden salınan lizozimin yapısal bütünlüğünü koruyup korumadığını belirlemek amacıyla sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır (Nikfarjam ve ark., 2020). Referans protein karışımı için molekül ağırlıkları 14,4 kDa – 116 kDa arasında değişen proteinleri içeren molekül ağırlığı belirteci kullanılmıştır.

Standart lizozim çözeltileri; % 0,01 (a/h) SDS içeren pH 7,4 fosfat tamponu ile 12,5 ve 6,25 $\mu\text{g/ml}$ lizozim içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Bölüm 2.1.4’de anlatıldığı şekilde hazırlanan ayırma jel çözeltisi öncelikle cam plakalar arasına ilave edilmiştir. Ayırma jel çözeltisinin donmasını takiben yükleme jel çözeltisi ilave edilmiştir. Hemen ardından üzerine plastik tarak yerleştirilmiştir.

Yükleme jelinin oluşmasını takiben tarak çıkartılarak örneklerin uygulanacağı kuyucuklar elde edilmiştir.

Örnekler, 25 µl lizozim çözeltisi ve 15 µl örnek yükleme tamponunun karıştırılması ile hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 20 µl olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Referans protein karışımı (molekül ağırlığı belirteci) ilgili işlemlere tabi olmaksızın 12 µl olacak şekilde yüklenmiştir. Cam plakalar içindeki jel, mini dikey elektroforez sistemine yerleştirilir ve örnekler yüklenir. İç ve dış rezervuarlar elektroforez tampon çözeltisi ile gerekli yerlere kadar doldurulmuştur. Tüm bu işlemlerden sonra örnekler 120 voltluk sabit akım altında 45 dakika ve 80 voltluk sabit akım altında 1 saat 45 dakika yürütülmüştür.

Jeldeki protein bantlarının görünürlüğünün sağlanması için Coomassie Brilliant Blue ile boyama yöntemi kullanılmıştır (Spiers ve ark., 1999). Jel 2 kez 200 ml ultra saf su ile 5'er dakika çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kolloidal Coomassie Brilliant Blue G250 içeren boyama çözeltisi eklenip bantlar görülünceye ve iyice belirginleşinceye kadar (1 gece) boyama işlemine devam edilmiştir.

Boyama çözeltisinden alınan jel, arındırma çözeltisi içinde bekletilerek arka plandaki rengin açılması sağlanmıştır. Örneklerle ait bantların tam olarak görülebilmesi amacıyla işlem beş kez tekrar edilmiştir. Bu işlemden sonra jelde oluşan protein bantlarının resimleri çekilmiş ve kayıt edilmiştir.

2.4.7.11. Mikropartiküllerin Stabilitelerinin Belirlenmesi

Stabilite çalışmaları için belirlenen optimum mikropartikül formülasyonu liyofilize edildikten sonra buzdolabında (2-8 °C'de) 6 ay bekletilmiştir. Başlangıçta ve 6. ay sonunda alınan örneklerde partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı ile zeta potansiyel ölçümleri yapılarak stabiliteleri incelenmiştir.

2.4.8. Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Belirlenmesi

Kuru toz inhalasyon formülasyonları için optimum mikropartikül formülasyonunun aerodinamik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla sekiz aşamalı Andersen cihazı kullanılmıştır (TF, 2017).

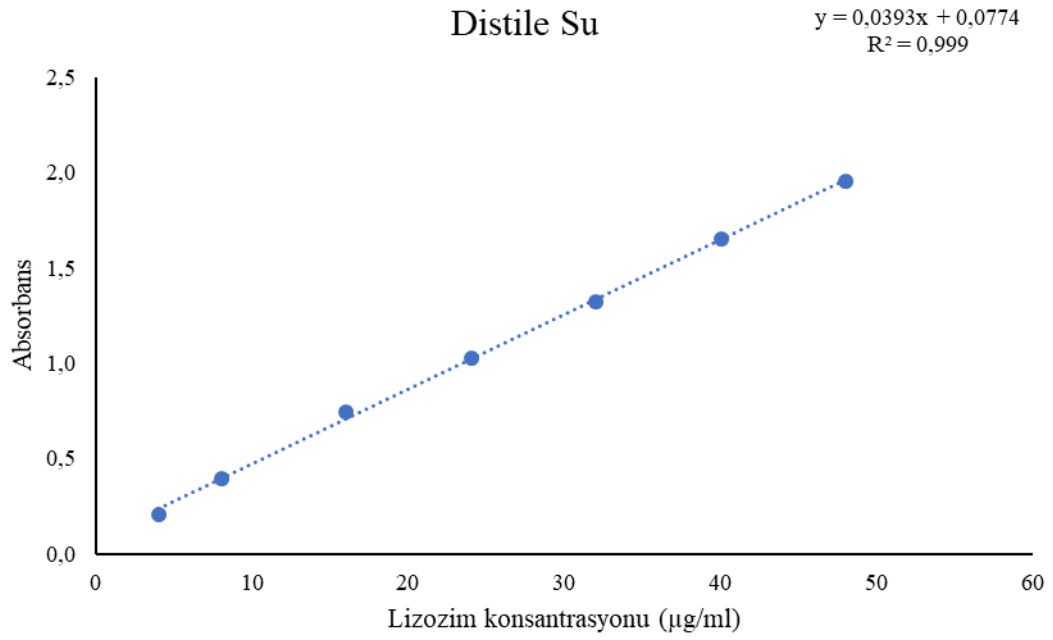
Andersen cihazında, üzerinde farklı büyüklüklerde delikler bulunan metal tabakalar, delik büyüklüğü en küçükten en büyüğe doğru olacak şekilde alttan üste doğru sıralanmış ve her bir tabaka arasına metal levhalar yerleştirilmiştir. Metal tabakalar arasına contalar konulup kelepçeler vasıtasıyla kapatılarak sistemin sızdırmazlığı sağlanmıştır. En alt tabakaya ise filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Ayırıştırıcı giriş konisi, indüksiyon girişine bağlanmış ve uygun bir ağızlık adaptörü kullanılarak indüksiyon girişi ile inhalatör arasında sızdırmazlık sağlanmıştır.

Mikropartiküller tartılarak No:4 sert jelatin kapsüllere doldurulmuştur. Kapsüller kuru toz inhalatöre (Aerolizer) yüklenmiş ve 60 l/dakika akış hızı ile 4 saniye süreyle hava geçirilerek aerosolize edilmiştir (Sham ve ark., 2004; Guchardi ve ark., 2008; Sivadas ve ark., 2008; Young ve ark., 2008; Kaye ve ark., 2009). Aynı işlem 10 kapsül için tekrarlanmıştır. Tüm kapsüller uygulandıktan sonra cihaz sökülmüş ve her bir aşamada toplanan mikropartikül miktarı belirlenmiştir. Elde edilen verilerden hareketle ince partikül fraksiyonu (İPF) ve kütleli ortalama aerodinamik çap (KOAC) ve değerleri hesaplanmıştır. İnce partikül dozu (İPD), 5 µm ya da 5 µm'den küçük partiküllerin kütlesi olarak tanımlanmaktadır ve her bir katın sınır çapına karşı kümülatif kütlenin grafiğe geçirilmesi ile edilen eğriden interpolasyonla hesaplanmıştır. İnce partikül fraksiyonu (İPF) ise İPD'nun her bir kapsüldeki toplam partikül miktarına oranlanması ile hesaplanmış ve % olarak ifade edilmiştir (Jalalipour ve ark., 2008; Minne ve ark., 2008; Sivadas ve ark., 2008). Partiküllerin kümülatif fraksiyonunun sınır çapına karşı log-olasılık grafiği çizilmiş ve % 50'e karşılık gelen çap KOAC olarak tanımlanmıştır (TF, 2017).

3. BULGULAR

3.1. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular

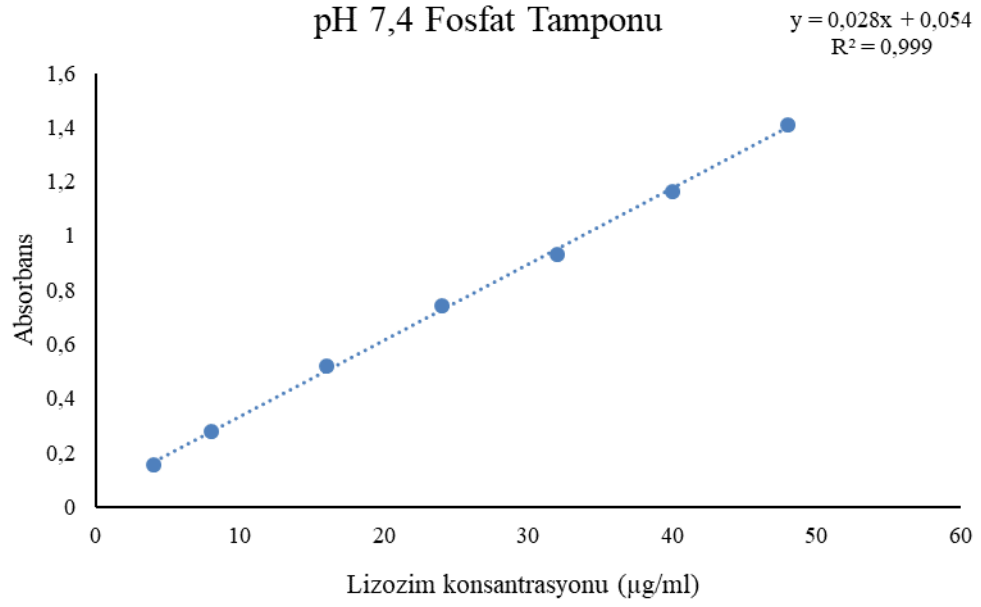
Etkin maddenin Bölüm 2.2.1.'de anlatılan şekilde distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde yapılan ölçümlerle elde edilen kalibrasyon doğruları Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de, bu doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Lizozimin distile sudaki kalibrasyon doğrusu

Çizelge 3.1. Lizozimin distile sudaki kalibrasyon doğrusuna ait parametreler

Ortam	Eğim±SS	Kesişim±SS	r ²
Distile su	0,0393±0,00158	0,0774±0,0295	0,999



Şekil 3.2. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusu

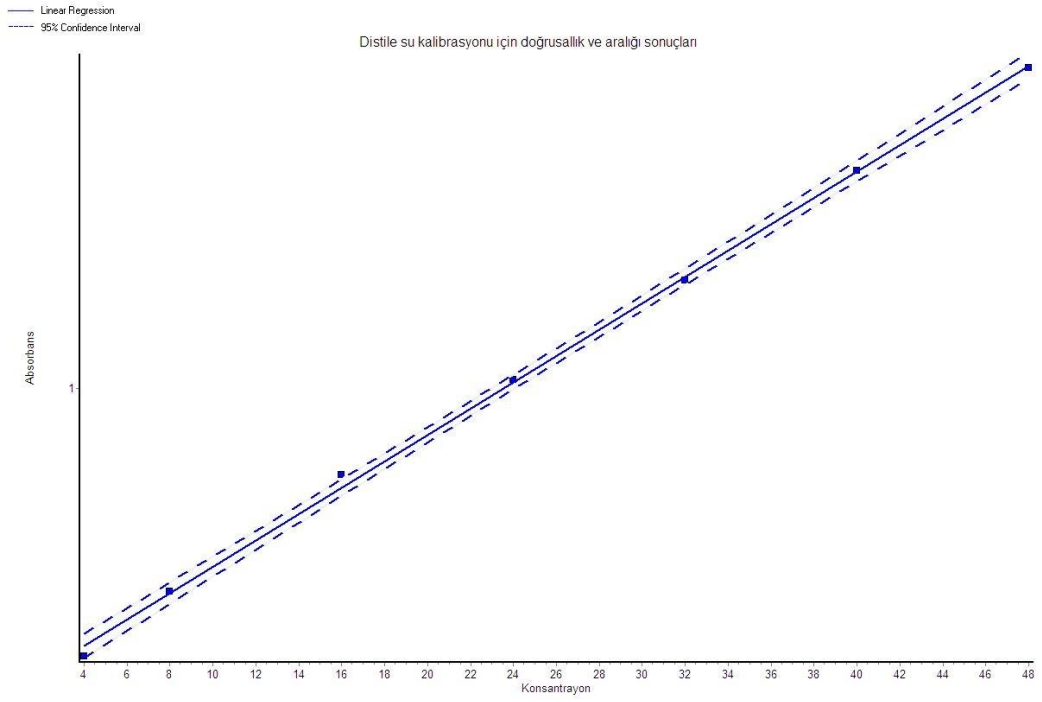
Çizelge 3.2. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponundaki kalibrasyon doğrusuna ait parametreler

Ortam	Eğim±SS	Kesişim±SS	r^2
pH 7,4 fosfat tamponu	0,028±0,00363	0,054±0,007238	0,999

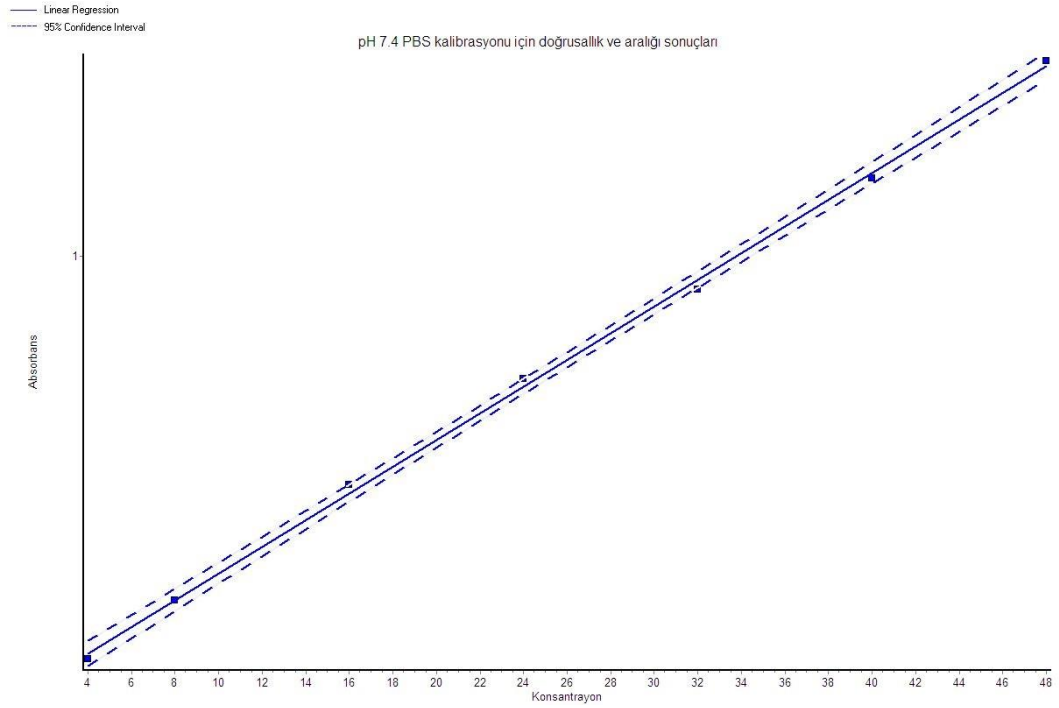
3.2. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular

3.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

Lizozimin distile sudaki ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayininin doğrusallık ve aralığı Bölüm 2.2.2.1’de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen doğrular Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’de, doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4’de verilmiştir.



Şekil 3.3. Lizozimin distile su içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık grafiği



Şekil 3.4. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık grafiği

Çizelge 3.3. Lizozimin distile su içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri

Eğim	0,0393
Eğimin standart hatası	0,0005532
Güven sınırları (%95)	0,03786-0,04070
Kesişim (n)	0,0774
Kesişimin standart hatası	0,01598
Kesişimin güven aralığı (%95)	0,03629-0,1184
Korelasyon katsayısı (r)	0,9995
Determinasyon katsayısı (r ²)	0,9990
Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası (Sy.x)	0,02222
Lineer regresyon kareler toplamı	2,490
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	0,002469
Ortalamanın artık kareler toplamı	4,938x10 ⁻⁴

Çizelge 3.4. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri

Eğim	0,02804
Eğimin standart hatası	0,0004042
Güven sınırları (%95)	0,02700-0,02908
Kesişim (n)	0,05398
Kesişimin standart hatası	0,01168
Kesişimin güven aralığı (%95)	0,02396-0,08400
Korelasyon katsayısı (r)	0,9995
Determinasyon katsayısı (r ²)	0,999
Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası (Sy.x)	0,01624
Lineer regresyon kareler toplamı	1,269
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	0,001318
Ortalamanın artık kareler toplamı	2,637x10 ⁻⁴

3.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Lizozimin distile sudaki ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayininin doğruluk ve geri eldesi Bölüm 2.2.2.2’de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.5. Lizozimin distile su içindeki miktar tayini yöntemine ait doğruluk ve geri elde bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)						
	8		24		40	
	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
1. Ölçüm	7,88	97,52	24,29	101,21	40,22	100,55
2. Ölçüm	7,95	99,43	24,57	102,37	39,61	99,02
3. Ölçüm	7,80	97,52	24,54	102,27	39,84	99,59
4. Ölçüm	7,95	99,43	24,24	100,99	39,68	99,21
5. Ölçüm	7,80	97,52	24,49	102,05	40,07	100,16
6. Ölçüm	7,95	99,43	24,67	102,79	39,28	98,19
Ortalama % Geri Elde	98,64		101,95		99,45	
SS	0,94		0,70		0,84	
BSS (%)	0,95		0,40		0,85	

Çizelge 3.6. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponu içindeki miktar tayini yöntemine ait doğruluk ve geri elde bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)						
	8		24		40	
	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
1. Ölçüm	8,25	103,12	23,25	96,87	39,53	98,84
2. Ölçüm	8,28	103,57	23,28	97,02	39,57	98,93
3. Ölçüm	8,36	104,46	23,28	97,02	39,89	99,73
4. Ölçüm	8,36	104,46	23,28	97,02	40,03	100,09
5. Ölçüm	8,43	105,36	23,57	98,21	40,03	100,09
6. Ölçüm	8,64	108,03	23,61	98,36	40,18	100,45
Ortalama % Geri Elde	104,84		97,42		99,69	
SS	1,75		0,68		0,66	
BSS (%)	1,67		0,69		0,66	

3.2.3. Ara Kesinlik

Lizozimin distile sudaki ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayininin ara kesinliği Bölüm 2.2.2.3’de açıklandığı şekilde belirlenmiştir. İki farklı günde yapılan ölçümlere ait ortalama, SS ve BSS değerleri Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Lizozimin distile sudaki kalibrasyonu için elde edilen ara kesinlik bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)						
	8		20		40	
	1. Gün	2. Gün	1. Gün	2. Gün	1. Gün	2. Gün
1. Ölçüm	7,88	7,83	24,29	23,70	40,22	39,86
2. Ölçüm	7,95	8,06	24,57	24,42	39,61	40,14
3. Ölçüm	7,80	7,83	24,54	24,26	39,84	39,94
4. Ölçüm	7,95	8,06	24,24	24,60	39,68	39,48
5. Ölçüm	7,80	7,83	24,49	24,34	40,07	40,28
6. Ölçüm	7,95	8,06	24,67	24,09	39,28	40,35
Ortalama	7,89	7,94	24,47	24,24	39,78	40,01
SS	0,07	0,13	0,17	0,31	0,34	0,32
BSS (%)	0,93	1,58	0,69	1,27	0,85	0,80

Çizelge 3.8. Lizozimin pH 7,4 fosfat tamponu kalibrasyonu için elde edilen ara kesinlik bulguları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)						
	8		20		40	
	1. Gün	2. Gün	1. Gün	2. Gün	1. Gün	2. Gün
1. Ölçüm	8,25	8,71	23,25	23,68	39,53	39,50
2. Ölçüm	8,28	8,75	23,28	23,71	39,57	39,46
3. Ölçüm	8,36	8,75	23,28	23,75	39,89	39,46
4. Ölçüm	8,36	8,82	23,28	23,79	40,03	39,43
5. Ölçüm	8,43	8,79	23,57	23,82	40,03	39,32
6. Ölçüm	8,64	8,93	23,61	23,86	40,18	39,07
Ortalama	8,39	8,79	23,38	23,77	39,88	39,38
SS	0,14	0,08	0,16	0,067	0,27	0,16
BSS (%)	1,67	0,87	0,69	0,28	0,66	0,41

3.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Lizozimin distile sudaki ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları Bölüm 2.2.2.4’de belirtildiği gibi belirlenmiştir. Çizelge 3.9’da hesaplanan teşhis ve tayin sınırları yer almaktadır.

Çizelge 3.9. Lizozimin distile sudaki ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yöntemine ait teşhis (LOD) ve tayin (LOQ) sınırı bulguları

	Teşhis sınırı (LOD) (µg/ml)	Tayin sınırı (LOQ) (µg/ml)
Distile su	0,814	2,466
pH 7,4 fosfat tamponu	0,427	2,582

3.2.5. Seçicilik

Lizozimin distile sudaki ve pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminde, lizozim yüklü mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan PCL ve PVA’nın lizozim ile girişim yapıp yapmadığını belirlemek için Bölüm 2.2.2.5’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen seçicilik tayininde yardımcı maddelere ait çözeltilerin 562 nm’de absorpsiyon vermemesi yöntemin lizozim için seçici olduğunu göstermiştir.

3.3. 2⁴ Full Faktöriyel Deney Tasarımı Kullanılarak Hazırlanan Mikropartikül Formülasyonları

Çalışmamızda lizozim içeren mikropartikül formülasyonları su içinde yağ içinde su (s/y/s) çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan mikropartikül formülasyonları 2⁴ full faktöriyel deney tasarımı kullanılarak

geliştirilmiştir. Kullanılan deney tasarımı lizozim konsantrasyonu, DCM hacmi, PVA hacmi ve homojenizasyon hızı bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Bağımsız değişkenler için düşük ve yüksek olmak üzere iki seviye belirlenmiştir. Kullanılan 2⁴ full faktöriyel deney tasarımı bağımsız değişkenler ve düzeyleri Çizelge 3.10’da verilmiştir. Faktöriyel deney tasarımı kullanılarak geliştirilen mikropartikül formülasyonlarının bileşenleri ise Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.10. Kullanılan 2⁴ full faktöriyel deney tasarımı bağımsız değişkenler ve düzeyleri

Bağımsız Değişkenler	Düzeyleri	
	Düşük	Yüksek
Lizozim konsantrasyonu (mg)	5	10
DCM hacmi (ml)	3	5
PVA hacmi (ml)	20	30
Homojenizasyon hızı (rpm)	8000	13500

DCM:Diklorometan

PVA:Polivinil alkol

Çizelge 3.11. 2⁴ full faktöriyel deney tasarımı kullanılarak geliştirilen mikropartikül formülasyonlarının bileşenleri

Formülasyon Kodu	Lizozim konsantrasyonu (mg)	DCM hacmi (ml)	PVA hacmi (ml)	Homojenizasyon hızı (rpm)
F1	10	3	30	13500
F2	10	5	20	8000
F3	5	5	30	8000
F4	10	5	30	8000
F5	5	5	30	13500
F6	10	3	30	8000
F7	7,5	4	25	9500
F8	10	5	30	13500
F9	5	3	30	8000
F10	7,5	4	25	9500
F11	5	3	20	8000
F12	10	3	20	8000
F13	5	3	20	13500
F14	7,5	4	25	9500
F15	5	3	30	13500
F16	10	5	20	13500
F17	7,5	4	25	9500
F18	5	5	20	8000
F19	10	3	20	13500
F20	5	5	20	13500

DCM:Diklorometan

PVA:Polivinil alkol

3.4. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulgular

3.4.1. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı Bulguları

2⁴ full faktöriyel deney tasarımı kullanılarak hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait ortalama partikül büyüklüğü ve span değerleri Çizelge 3.12’de sunulmuştur.

Çizelge 3.12. 2⁴ full faktöriyel tasarıma göre hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ve span bulguları (n=6)

Formülasyon Kodu	Partikül Büyüklüğü (µm±SS)	Span (±SS)
F1	29,38±0,59	1,90±0,17
F2	22,42±0,09	1,66±0,012
F3	31,02±0,04	1,43±0,004
F4	20,80±0,29	1,62±0,06
F5	48,05±1,20	2,36±0,067
F6	41,72±0,83	1,40±0,003
F7	21,32±0,09	1,49± 0,006
F8	8,03±0,05	1,98±0,004
F9	31,90±0,49	1,37±0,08
F10	17,95±0,10	1,92±0,016
F11	41,07±0,83	1,47±0,125
F12	34,23±0,18	1,39±0,01
F13	7,99±0,01	1,75±0,01
F14	18,42±0,11	1,66±0,015
F15	8,69±0,07	1,52±0,03
F16	8,75±0,04	2,69±0,03
F17	18,87±0,15	1,52±0,0018
F18	21,83±0,30	1,68±0,009
F19	28,82±0,04	1,32±0,005
F20	9,99±0,06	2,41±0,022

3.4.2. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Kapasitesi Bulguları

2⁴ full faktöriyel deney tasarımı kullanılarak hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi değerleri Çizelge 3.13'te sunulmuştur.

Çizelge 3.13. 2⁴ full faktöriyel tasarıma göre hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi bulguları (n=3)

Formülasyon Kodu	Enkapsülasyon Etkinliği (%±SS)	İlaç Yükleme Kapasitesi (%±SS)
F1	69,86±0,15	5,13±0,02
F2	79,94±1,37	2,84±0,07
F3	39,71±2,02	1,08±0,06
F4	69,65±1,08	3,60±0,05
F5	41,77±0,40	2,08±0,00
F6	69,70±1,44	4,31±0,01
F7	69,78±0,29	3,04±0,02
F8	62,50±0,00	1,81±0,00
F9	30,18±0,00	1,72±0,00
F10	68,58±0,54	2,67±0,01
F11	58,27±0,21	2,02±0,02
F12	75,43±0,00	3,03±0,00
F13	48,69±0,61	1,72±0,00
F14	62,14±0,00	2,81±0,01
F15	35,33±0,83	1,15±0,01
F16	65,15±0,00	3,91±0,00
F17	66,16±0,22	3,43±0,06
F18	53,46±0,00	2,00±0,03
F19	65,84±0,58	3,27±0,09
F20	59,49±1,70	2,11±0,04

3.4.3. Mikropartiküllere Ait İmalat Verimi Bulguları

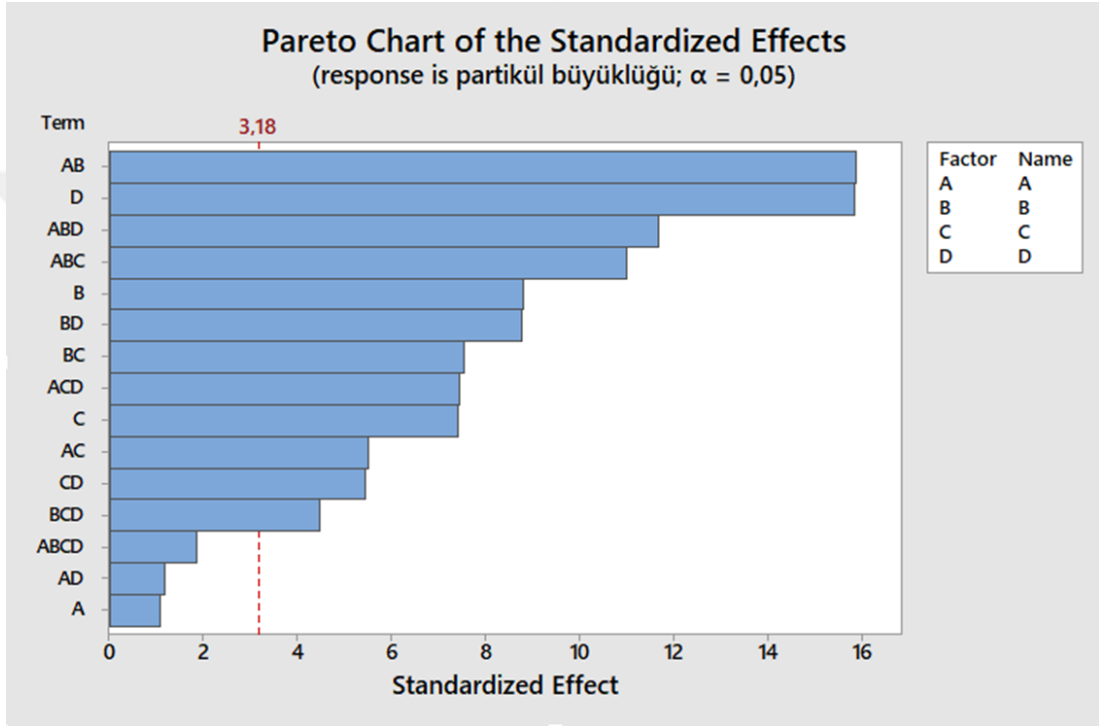
Lizozim içeren mikropartikül formülasyonlarına ait imalat verimi Bölüm 2.2.5.3’de belirtildiği şekilde belirlenmiş ve elde edilen bulgular Çizelge 3.14’te sunulmuştur.

Çizelge 3.14. 2⁴ full faktöriyel deney tasarımı göre hazırlanan mikropartikül formülasyonlarına ait imalat verimi bulguları

Formülasyon Kodu	İmalat Verimi (%)
F1	77,18
F2	83,27
F3	89,34
F4	82,95
F5	88,33
F6	78,71
F7	65,55
F8	86,55
F9	81,52
F10	81,51
F11	79,77
F12	86,52
F13	65,89
F14	86,95
F15	60,77
F16	79,35
F17	85,02
F18	86,01
F19	77,58
F20	88,72

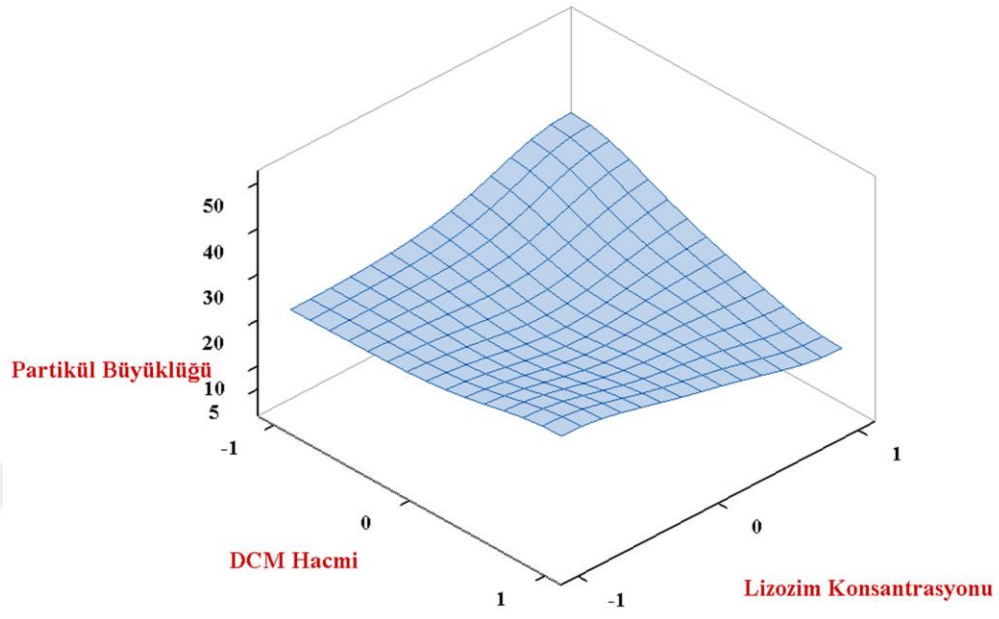
3.5. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulguların İstatistiksel Analizi

2^4 full faktöriyel deney tasarımına göre hazırlanan mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü değerlerinin istatistiksel analizi Minitab Statistical Software 17 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da sunulmuştur.

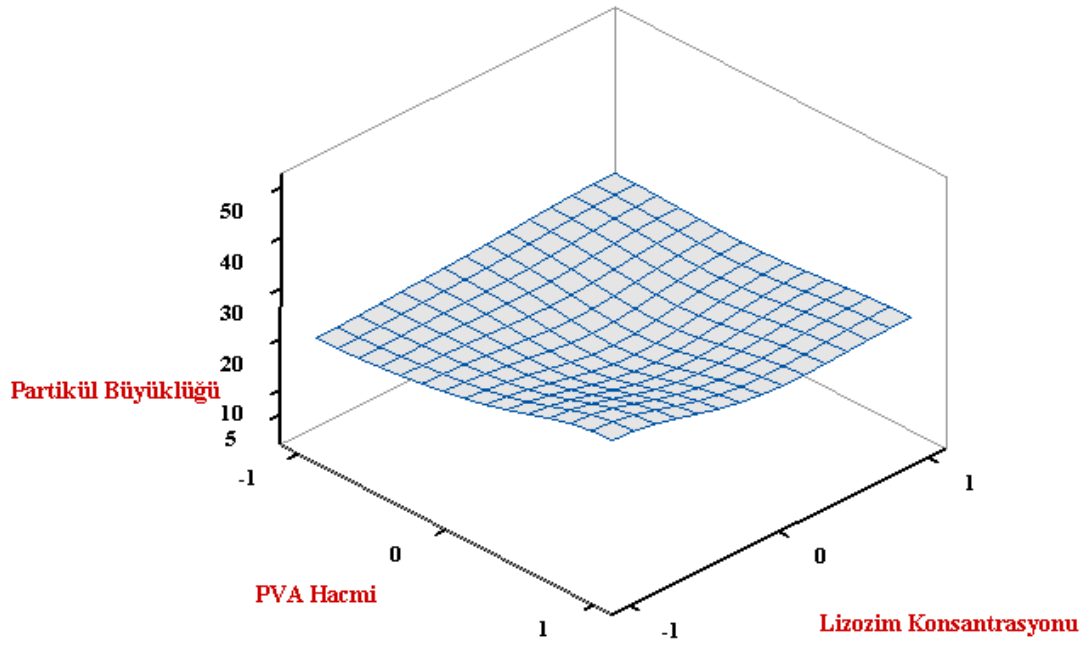


Şekil 3.5. Üretim parametrelerinin (A:lizozim konsantrasyonu, B:DCM hacmi, C:PVA hacmi ve D:homojenizasyon hızı) mikropartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisini gösteren Pareto etki grafiği

a)

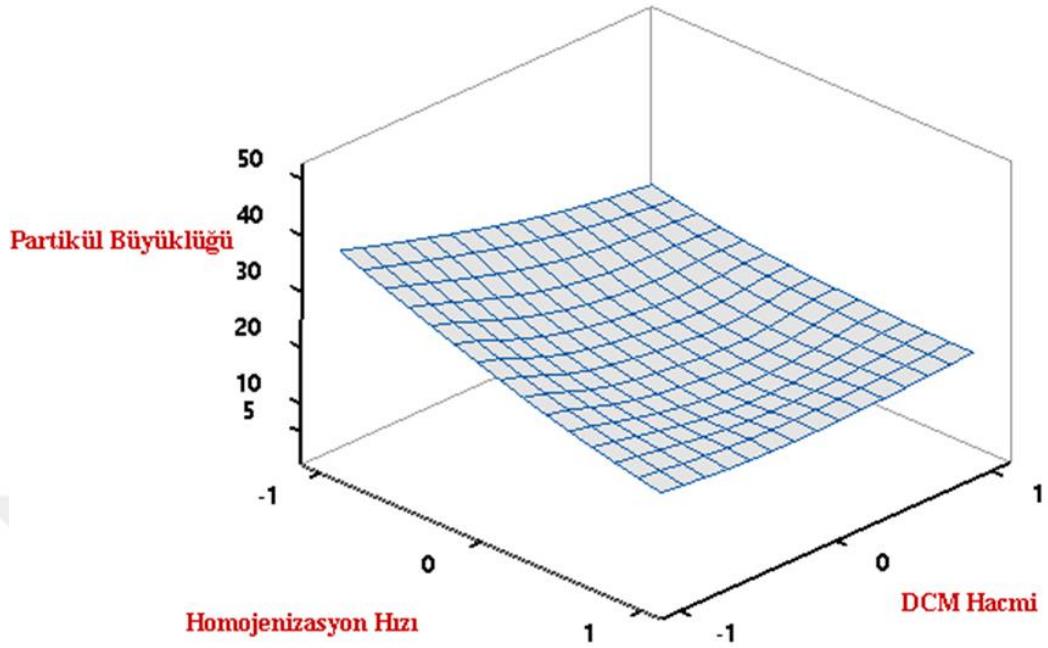


b)

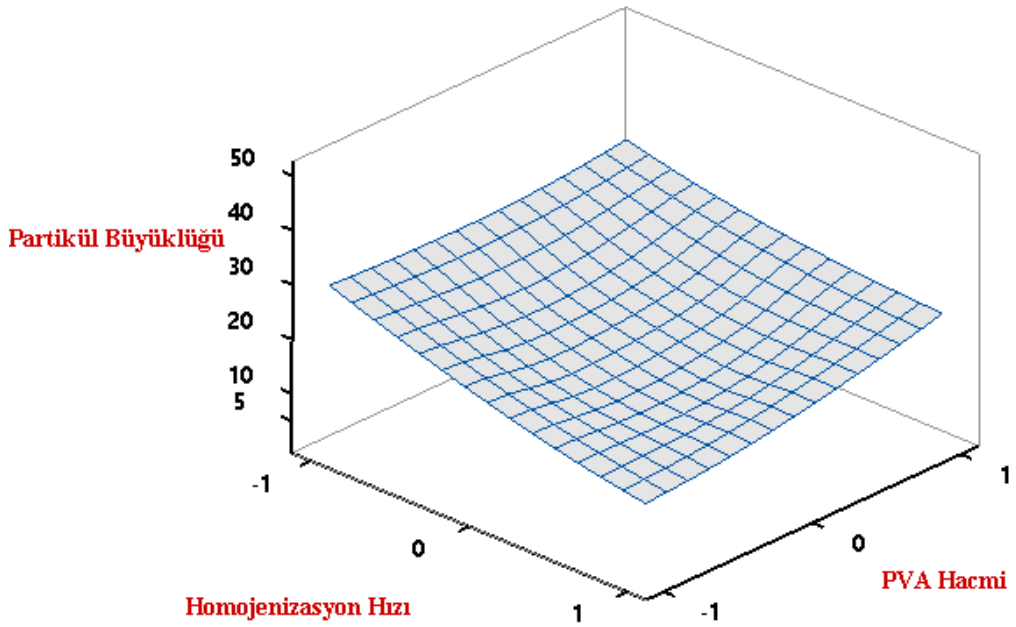


Şekil 3.6. Mikropartikül formülasyonlarının yüzey-yanıt grafiği (Bağımlı değişken: Partikül büyüklüğü).

c)

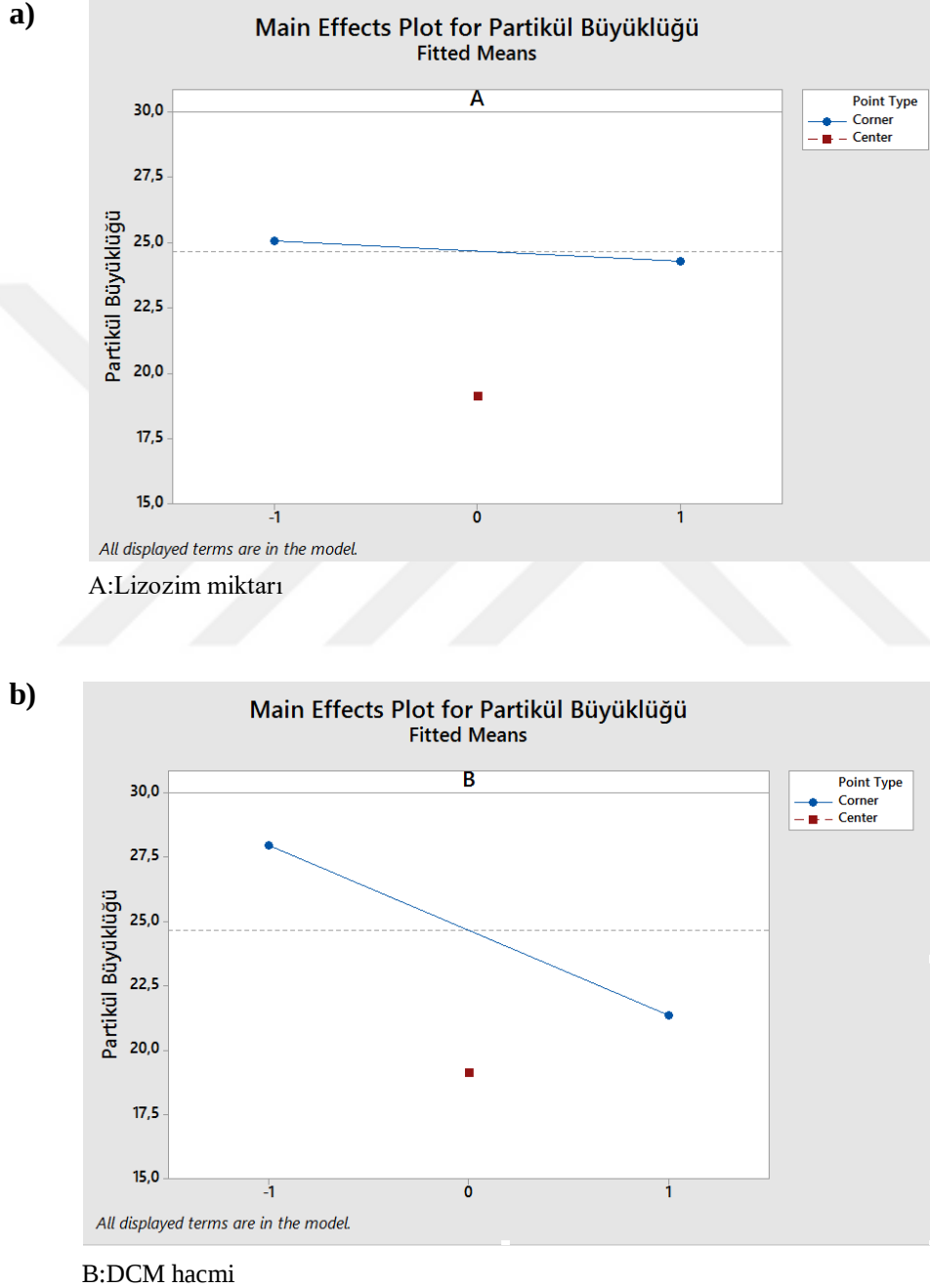


d)

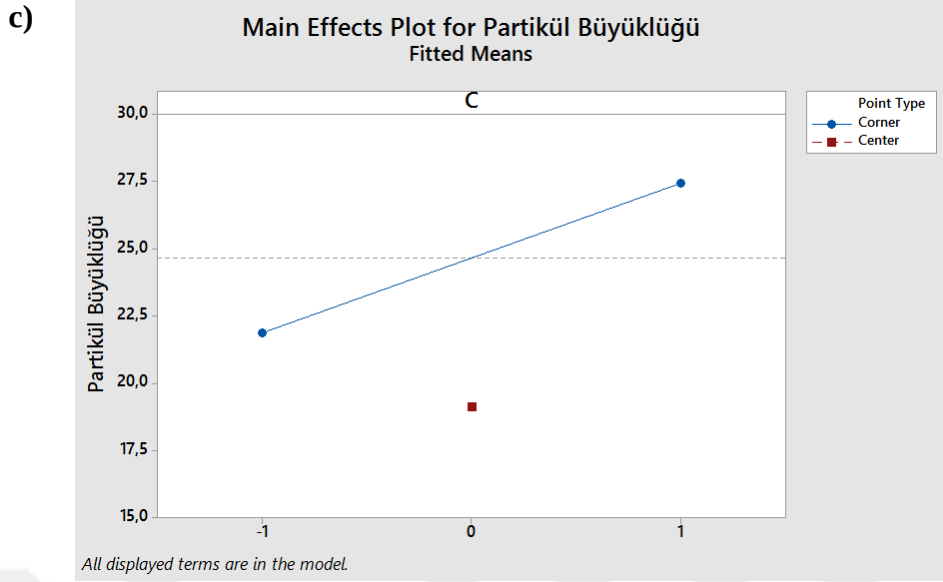


Şekil 3.6. Devam Mikropartikül formülasyonlarının yüzey-yanıt grafiği (Bağımlı değişken: Partikül büyüklüğü).

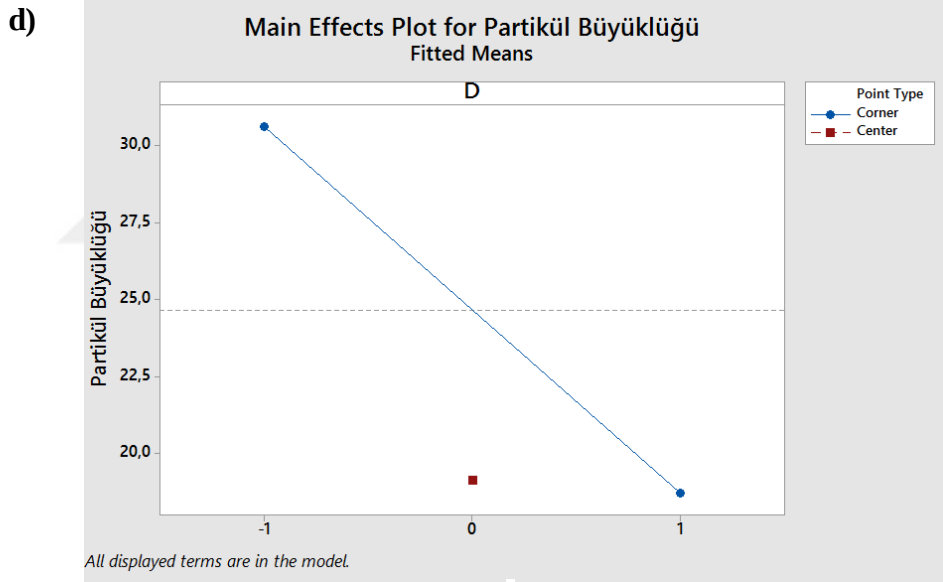
Bölüm 2.2.4’te anlatılan 2^4 full faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen lizozim miktarı (A), DCM hacmi (B), PVA hacmi (C) ve homojenizasyon hızının (D) ortalama partikül büyüklüğü değerleri üzerine etkisine ilişkin sonuçların grafiksel gösterimi ise Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7. 2^4 full faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen lizozim miktarı (a), DCM hacmi (b), PVA hacmi (c) ve karıştırma hızının (d) miropartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi.



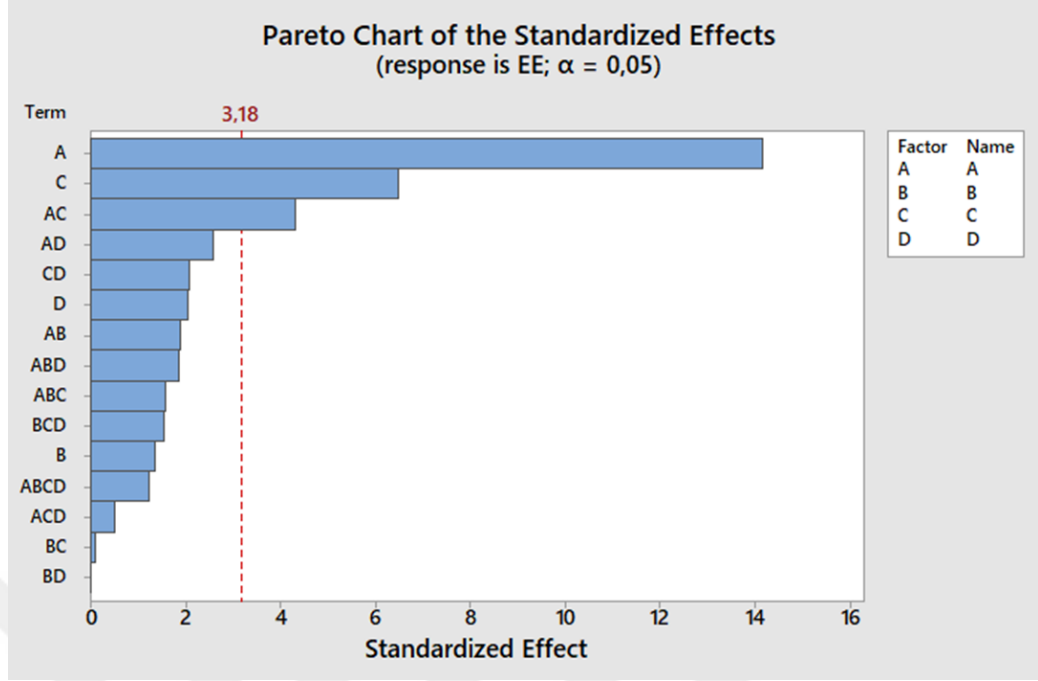
C:PVA hacmi



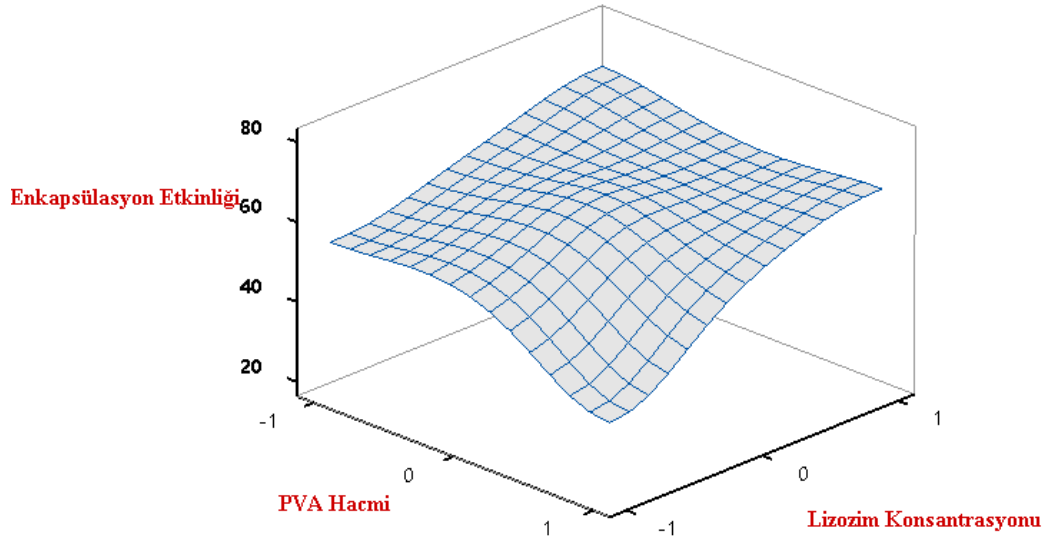
D: Karıştırma hızı

Şekil 3.7. Devam 2^4 full faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen lizozim miktarı (a), DCM hacmi (b), PVA hacmi (c) ve karıştırma hızının (d) miropartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi.

2^4 full faktöriyel deney tasarımına göre hazırlanan mikropartiküllere ait enkapsülasyon etkinliği değerlerinin istatistiksel analizi Minitab Statistical Software 17 analiz programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da sunulmuştur.

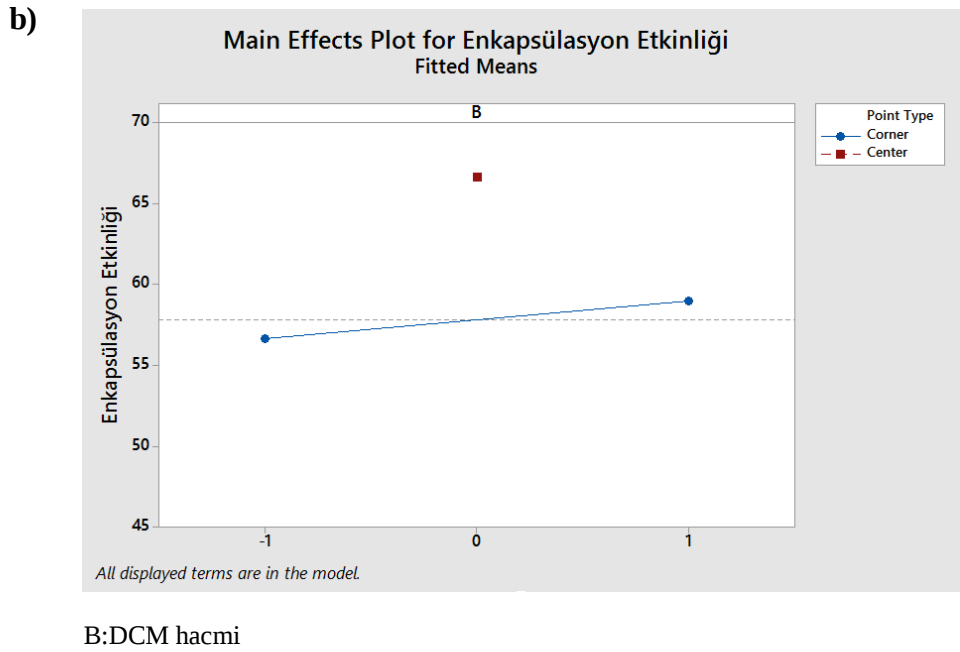
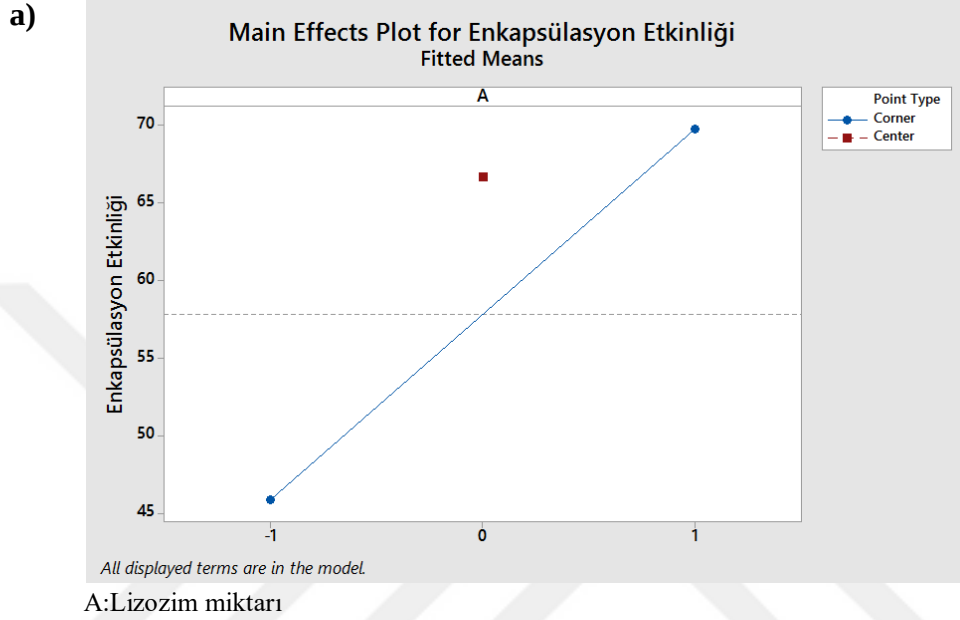


Şekil 3.8. Üretim parametrelerinin (A:lizozim konsantrasyonu, B:DCM hacmi, C:PVA hacmi ve D:karıştırma hızı) mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini gösteren Pareto etki grafiği



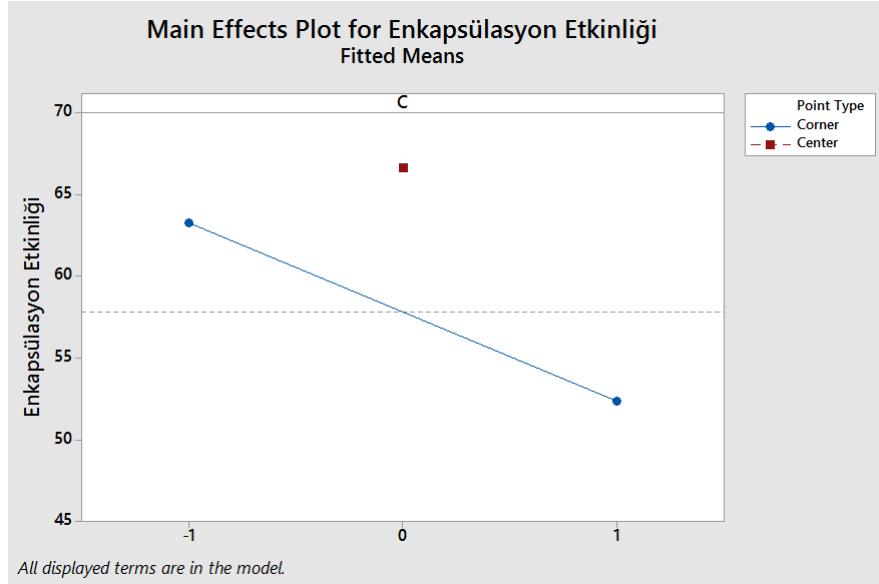
Şekil 3.9. Mikropartikül formülasyonlarının yüzey-yanıt grafiği (Bağımlı değişken: Enkapsülasyon etkinliği).

Bölüm 2.2.4'te anlatılan 2^4 faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen lizozim miktarı (A), DCM hacmi (B), PVA hacmi (C) ve karıştırma hızının (D) enkapsülasyon etkinliği değerleri üzerine etkisine ilişkin sonuçların grafiksel gösterimi ise Şekil 3.10'da verilmiştir.



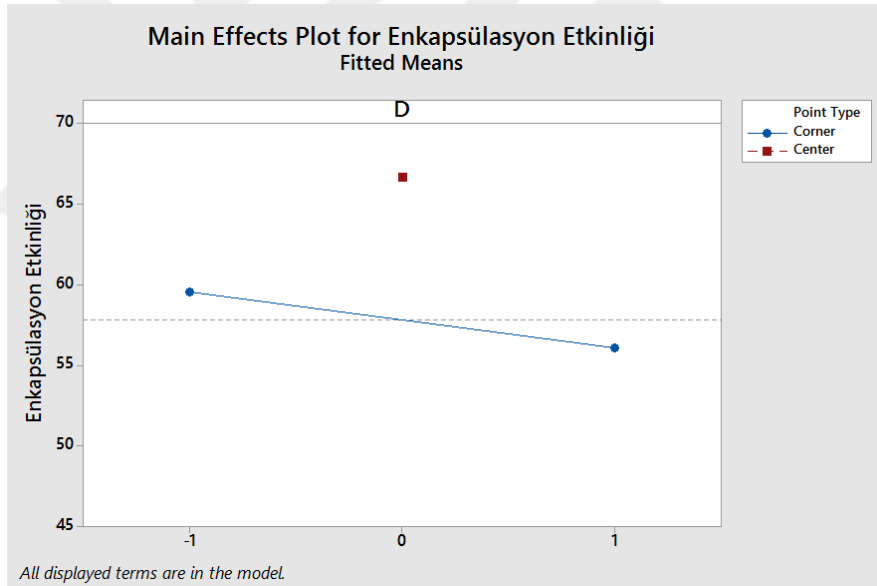
Şekil 3.10. 2^4 faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen lizozim miktarı (a), DCM hacmi (b), PVA hacmi (c) ve karıştırma hızının (d) mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi.

c)



C: PVA hacmi

d)

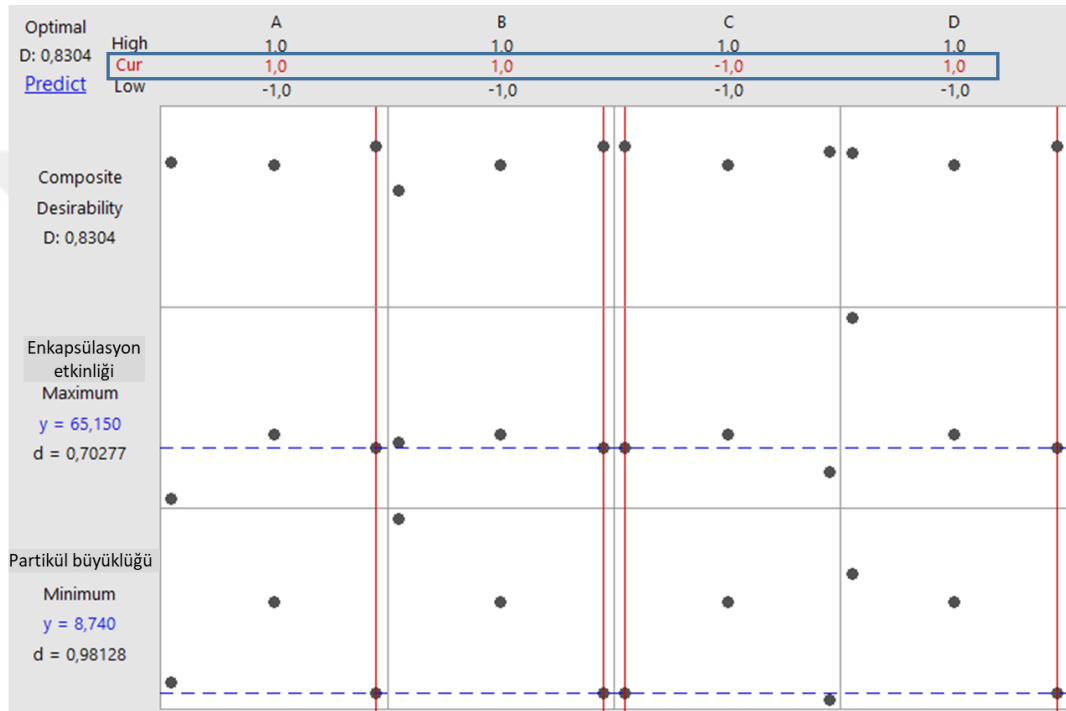


D: Homojenizasyon hızı

Şekil 3.10. Devam 2^4 faktöriyel deney tasarımı ile elde edilen lizozim miktarı (a), DCM hacmi (b), PVA hacmi (c) ve karıştırma hızının (d) mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

3.6. Optimum Mikropartikül Formülasyonunun Belirlenmesi

Optimum mikropartikül formülasyonunun belirlenmesi için, 2^4 full faktöriyel deney tasarımına göre hazırlanan mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği değerlerinin Minitab Statistical Software 17 analiz programı kullanılarak yapılan istatistiksel analizi sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.11. 2^4 full faktöriyel deney tasarımına göre hazırlanan mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

3.7. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Bulgular

2^4 full faktöriyel deney tasarımı sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda belirlenen optimum formülasyona ait partikül büyüklüğü, span değeri, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri Çizelge 3.15’te sunulmuştur.

Çizelge 3.15. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait partikül büyüklüğü, span, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri (n=3)

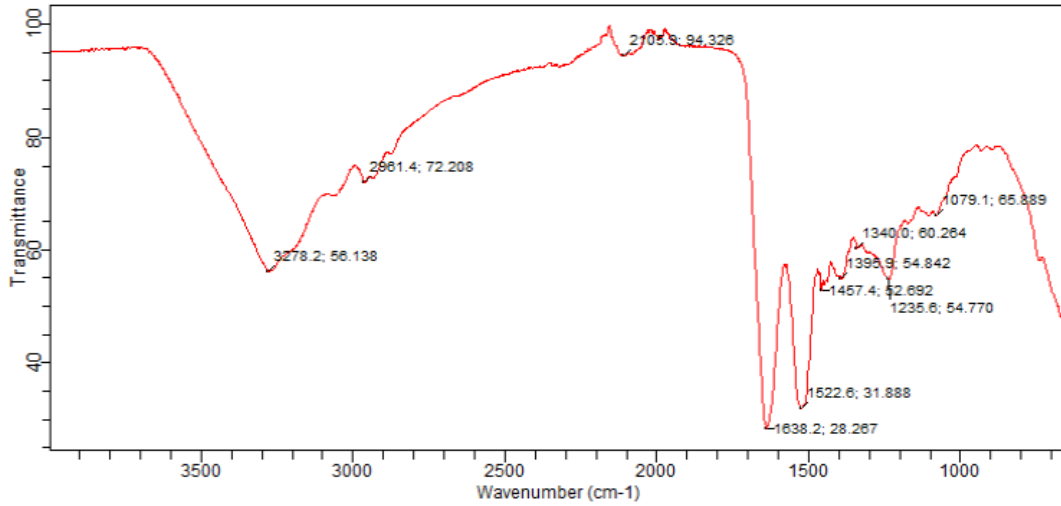
	Partikül Büyüklüğü ($\mu\text{m} \pm \text{SS}$)	Span $\pm\text{SS}$	Zeta Potansiyeli ($\text{mV} \pm \text{SS}$)	EE (% $\pm\text{SS}$)
Optimum Formülasyon	9,82 $\pm$ 0,34	2,80 $\pm$ 0,56	-17,20 $\pm$ 0,75	75,70 $\pm$ 1,50

EE:Enkapsülasyon etkinliği
SS:Standart sapma

3.8. FTIR Analizine Ait Bulgular

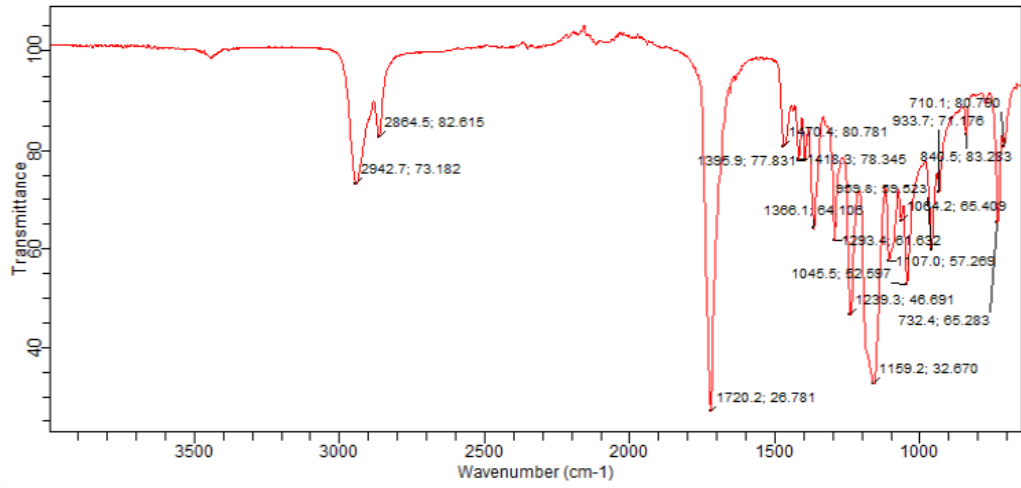
Lizozime, PCL'a ve optimum mikropartikül formülasyonuna ait FTIR spektrumları Bölüm 2.2.7.5'te açıklandığı gibi alınmıştır. Elde edilen FTIR spektrumları Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

a)

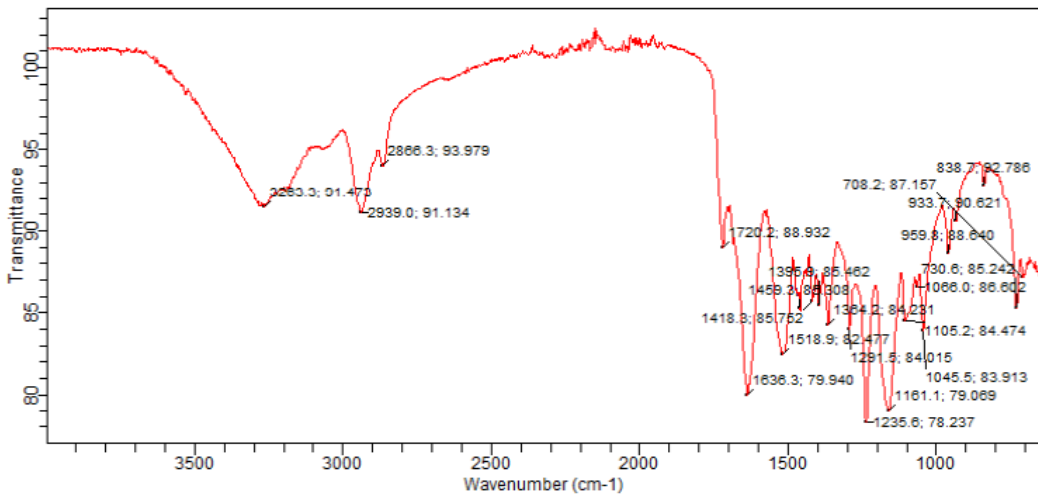


Şekil 3.12. (a) Lizozime, (b) PCL'a, (c) optimum mikropartikül formülasyonuna ait FTIR spektrumları

b)



c)

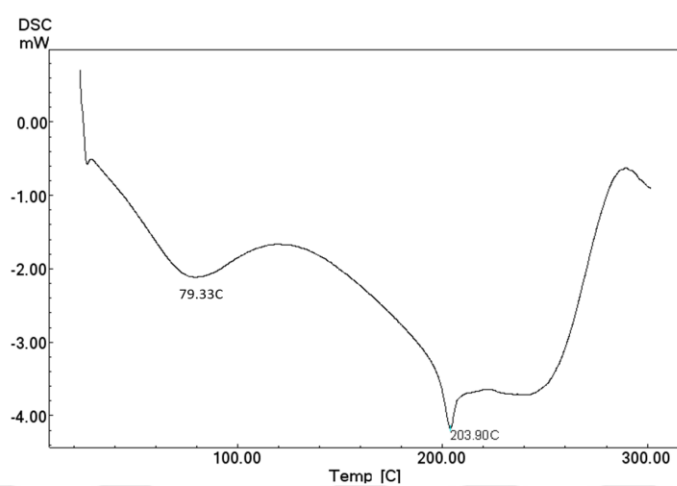


Şekil 3.12. a) Lizozime, (b) PCL'a, (c) optimum mikropartikül formülasyonuna ait FTIR spektrumları

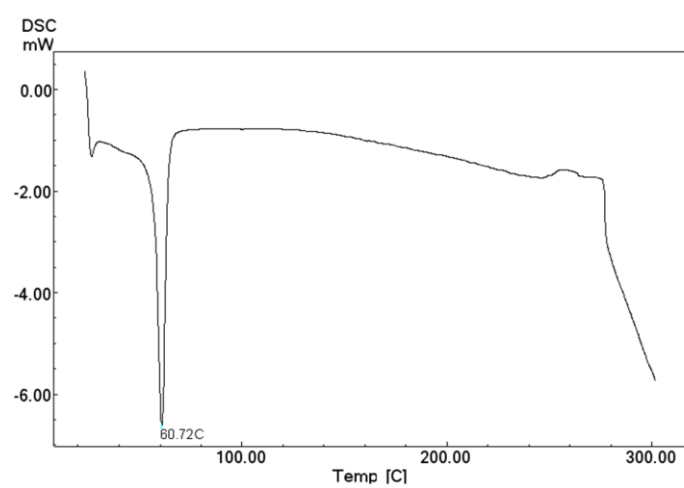
3.9. DSC Analizine Ait Bulgular

Lizozim, PCL ve optimum mikropartikül formülasyonunun termal özellikleri Bölüm 2.2.7.6'da anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.13'te yer almaktadır.

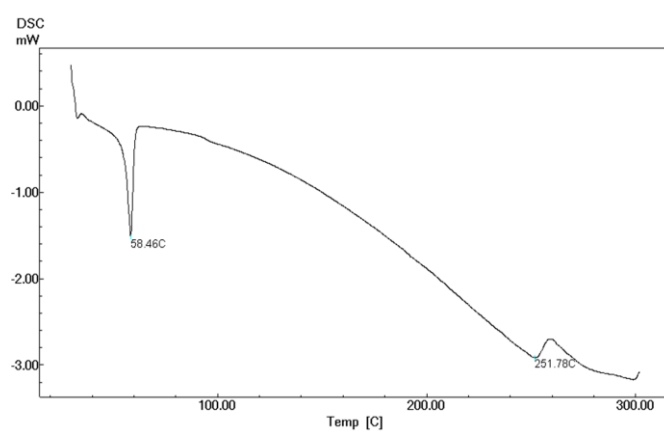
a)



b)



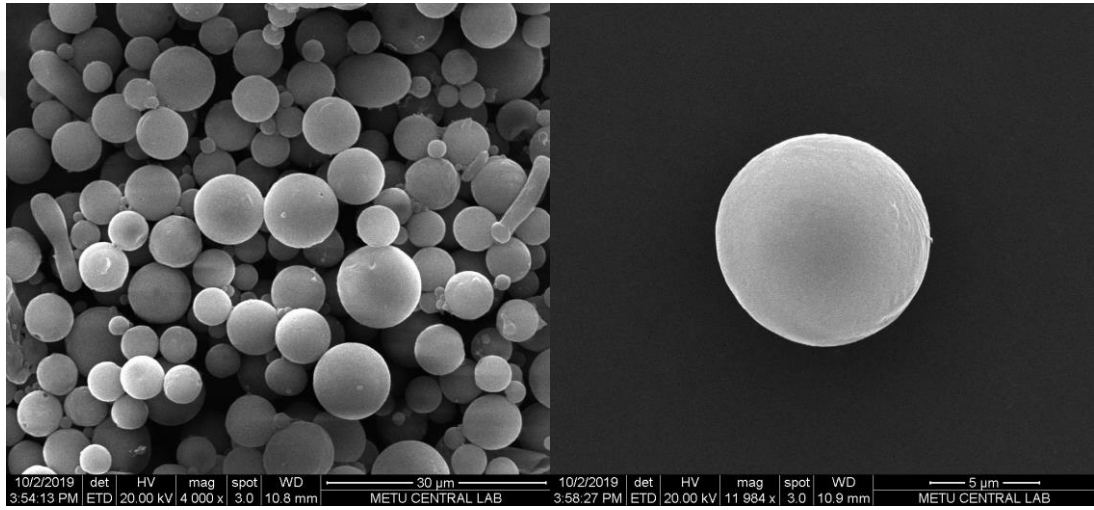
c)



Şekil 3.13. (a) Lizozime, (b) PCL'a ve (c) optimum mikropartikül formülasyonuna ait DSC termogramları

3.10. Mikropartiküllerin SEM Analizine Ait Bulgular

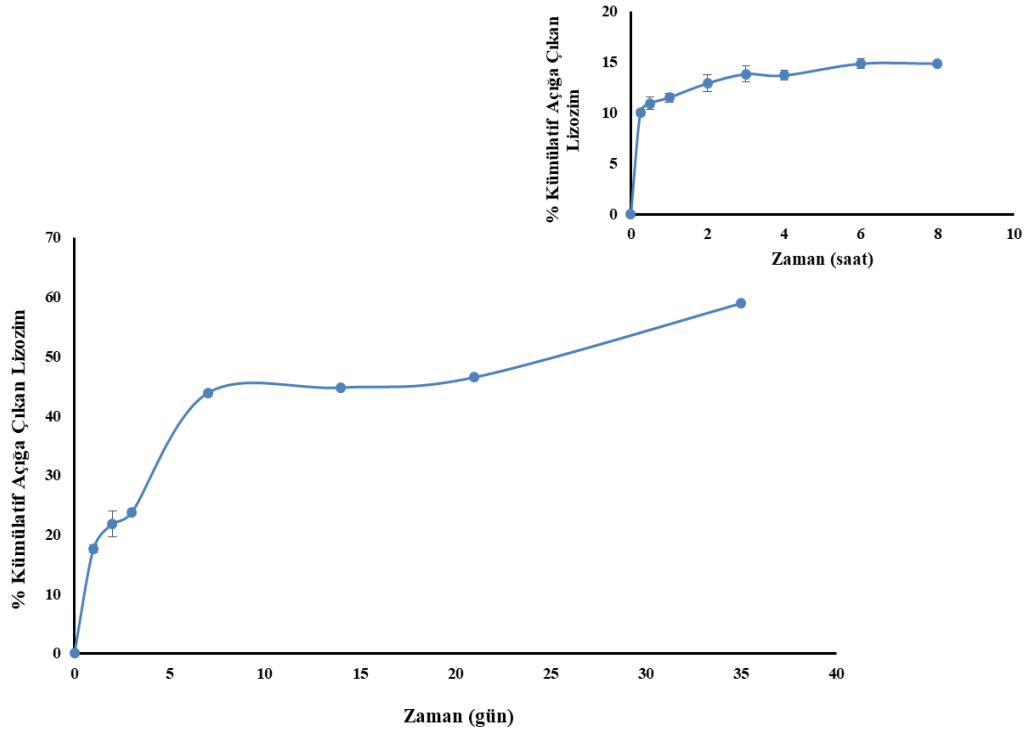
Optimum mikropartikül formülasyonunun morfolojisini belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.7.7'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen SEM analizine ait görüntüler Şekil 3.14'te yer almaktadır.



Şekil 3.14. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait SEM görüntüsü

3.11. Çözünme Hızı

Optimum mikropartikül formülasyonuna ait etkin madde salım profili Bölüm 2.2.7.8'de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Elde edilen çözünme hızı grafiği Şekil 3.15'te verilmiştir.



Şekil 3.15. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait çözünme hızı grafiği (n=3).

3.12. Çözünme Hızı Kinetikleri

Optimum mikropartikül formülasyonuna ait elde edilen salım profili için Bölüm 2.2.5.10’da belirtildiği şekilde gerçekleştirilen kinetik değerlendirme sonuçları Çizelge 3.16’da verilmiştir.

Çizelge 3.16. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait in vitro salım kinetikleri

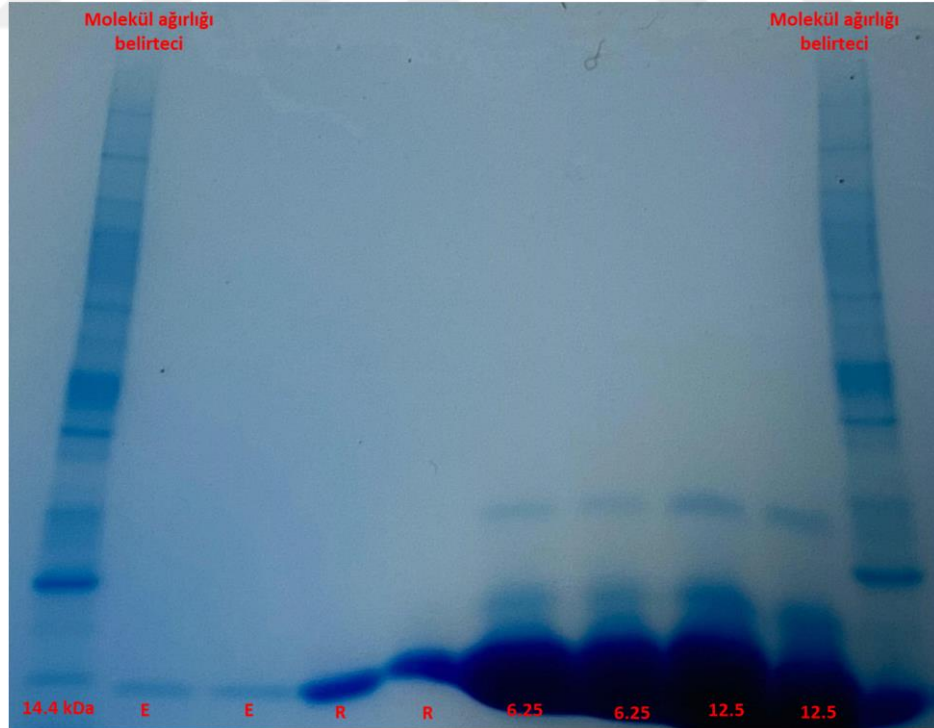
0°	r^2	0,735
	k_0	1,351
	SH	0,331
	RMS	116,814
1°	r^2	0,821
	k_1	0,021
	SH	0,004
	RMS	0,018
Higuchi	r^2	0,914
	kh	9,332
	SH	1,168
	RMS	37,842

Çizelge 3.16. Devam Optimum mikropartikül formülasyonuna ait in vitro salım kinetikleri

Peppas	r^2	0,948
	n	0.349
	SH	0,037
	RMS	0,003
Weibull	r^2	0,950
	β	0,432
	SH	0,044
	Td	0,978
	RMS	0,004
Hixson-Crowell	r^2	0,381
	kh	0,062
	SH	0,032
	RMS	1,110

3.13. SDS-PAGE Analizine Ait Bulgular

Lizozimin yapısal bütünlüğünü belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.5.11’de belirtilen şekilde gerçekleştirilen SDS-PAGE analizine ait jel görüntüsü Şekil 3.16’da yer almaktadır.



Şekil 3.16. Lizozimin SDS-PAGE ile elektroforetik analiz sonuçları. 1,10:Molekül ağırlığı belirteci; 2,3:mikropartiküllerden ekstrakte edilen lizozim; 4,5:mikropartiküllerden salınan lizozim; 6,7: 6,25 µg/ml lizozim çözeltisi; 8,9: 12.5 µg/ml lizozim çözeltisi

3.14. Mikropartiküllerin Stabilitelerinin Belirlenmesi

Optimum mikropartikül formülasyonuna ait stabilite çalışmaları Bölüm 2.2.5.13’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.17’de yer almaktadır.

Çizelge 3.17. +4°C’de bekletilen mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü, span ve zeta potansiyeli değerleri (n=3)

Zaman	Partikül Büyüklüğü ($\mu\text{m}\pm\text{SS}$)	Span $\pm\text{SS}$	Zeta Potansiyeli ($\text{mV}\pm\text{SS}$)
0. ay	9,72 $\pm$ 0,34	2,80 $\pm$ 0,56	-17,2 $\pm$ 0,75
6. ay	8,88 $\pm$ 0,12	2,33 $\pm$ 0,13	-15,5 $\pm$ 0,82

3.15. Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerine Ait Bulgular

Optimum mikropartikül formülasyonunun aerodinamik özelliklerinin belirlenmesi için Bölüm 2.2.8’de belirtildiği gibi Andersen cihazı kullanılmıştır. Mikropartiküllere ait İPF ve KOAÇ değerleri Çizelge 3.18’de verilmiştir.

Çizelge 3.18. Optimum mikropartikül formülasyonuna ait İPF ve KOAÇ değerleri

	İPF (%)	KOAÇ
Optimum Formülasyon	50,99 $\pm$ 2,89	5,44 $\pm$ 0,18

İPF: İnce partikül fraksiyonu

KOAÇ: Kütleli ortalama aerodinamik ap

4.TARTIŞMA

4.1. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

4.1.1. Etkin Maddenin Çeşitli Ortamlardaki MikroBCA ile Analizi

Lizozimin Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Çizelge 3.1, Çizelge 3.2’de yer alan distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içinde mikroBCA yöntemi ile yapılan kalibrasyon doğrusuna ait r^2 değerlerinin 1’e yakın olması, okunan absorbanslardan bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar vereceğini göstermektedir.

4.1.2. Etkin Maddenin MikroBCA Analiz Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Lizozimin mikroBCA yöntemi ile kalibrasyonunun validasyonu, kullanılan analitik yöntemin doğru, kesin ve tekrarlanabilir olduğunu göstermek amacıyla ICH’nın Q2 kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.1. Doğrusallık ve Aralığı

Lizozimin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içinde mikroBCA yöntemi ile elde edilen kalibrasyonunun validasyonu amacıyla incelenen doğrusallık ve aralığı deneyi sonucunda elde edilen doğrunun r^2 değerinin yüksek, regresyon doğrusundan sapmaların standart hatasının düşük oluşu (Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Çizelge 3.3, Çizelge 3.4) elde edilen verilerin güvenilirliğini göstermektedir.

4.1.2.2. Doğruluk ve Geri Elde

Bölüm 2.2.2.2’de anlatıldığı şekilde incelenen analitik yöntemin doğruluğuna ilişkin sonuçlar Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6’da verilmiştir. Lizozimin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponundaki hesaplanan BSS değerlerinin % 2’den küçük olması yöntemin doğruluğunu kanıtlamıştır.

4.1.2.3. Ara Kesinlik

Ara kesinlik için farklı iki günde yapılan ölçümlere ait verilere (Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8) SPSS 20 bilgisayar programı kullanılarak ortalamalar arası farkın önemlilik testi uygulanmış ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

4.1.2.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Lizozimin distile su ve pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki mikroBCA yöntemi ile miktar tayinine ilişkin hesaplanan teşhis sınırları (LOD) (0,814 ve 0,427 $\mu\text{g/ml}$) ve tayin sınırları (LOQ) (2.466 ve 2,582 $\mu\text{g/ml}$) değerlerinin kalibrasyon doğrusunda yer alan en küçük konsantrasyon değeri olan 4 $\mu\text{g/ml}$ ’den küçük olması kalibrasyon aralıklarımızın lizozimin tayin edilebildiği aralıkta olduğunu göstermiştir.

4.1.2.5. Seçicilik

Seçicilik parametresi incelendiğinde formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin mikroBCA analizi sonucunda lizozim ile girişim yapmaması yöntemin lizozim için seçici olduğunu doğrulamıştır.

4.2. Mikropartikül Formülasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda lizozim içeren mikropartikül formülasyonları s/y/s emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Lizozim suda çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle suda çözünen etkin maddelerin enkapsülasyonu için sıklıkla kullanılan bu mikropartikül hazırlama yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Polimer olarak biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu bir polimer olması nedeniyle PCL kullanılmıştır.

Lizozim yüklü mikropartiküller Bölüm 2.2.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. S/y/s emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde dış sulu faza dispersiyon ajanının eklenmesi, birbirinden ayrı küresel mikropartiküllerin başarılı üretimi için kritik bir parametredir. Dispersiyon ajanının rolü, sürekli fazın yüzey gerilimini düşürerek çözücünün uzaklaşması sırasında mikropartiküllerin koagülasyonunu önlemek ve emülsiyonu stabilize etmektir. Bu amaçla, öncelikle dış sulu fazda kullanılacak dispersiyon ajanının tipi ve konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Dış sulu fazda dispersiyon ajanı olarak Pluronic F68'in kullanıldığı formülasyonlarda agregat oluştuğu ve küresel mikropartiküllerin elde edilemediği görülmüştür. Bu nedenle dış sulu fazda dispersiyon ajanı olarak Tween 60 kullanılarak mikropartiküller hazırlanmaya çalışılmıştır. Ancak bu formülasyonda da mikropartiküller elde edilememiştir. Dış sulu fazda dispersiyon ajanı olarak PVA'nın kullanıldığı formülasyonda ise mikropartikül oluşumu gerçekleştiği ve agregat oluşumu gözlenmediği için dış sulu faz olarak PVA çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Mikropartiküllerin hazırlanmasında uygulanan formülasyon parametrelerinin ürün kalitesini nasıl etkilediğini araştırmak için 2^4 full faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Yapılan literatür incelemeleri ve daha önceki çalışmalarımızda edindiğimiz bilgiler sonucunda lizozim içeren mikropartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve proses parametrelerinin etkin madde miktarı, organik çözücü hacmi, dış sulu faz hacmi ve karıştırma hızı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, kullanılan deney tasarımında bağımsız değişken olarak

lizozim miktarı (mg), DCM hacmi (ml), PVA hacmi (ml) ve homojenizasyon hızı (rpm) seçilmiştir. Bağımsız değişkenler için düşük ve yüksek olmak üzere iki seviye belirlenmiştir (Çizelge 3.10). 2⁴ full faktöriyel deney tasarımı kullanılarak geliştirilen mikropartikül formülasyonlarının bileşenleri Çizelge 3.11’de verilmiştir. Optimizasyon işlemi sonucunda, seçilen bağımlı değişkenler ile etkin madde içeriği yüksek ve akciğerlere hedeflenebilecek uygun partikül büyüklüğüne sahip mikropartikül formülasyonlarının hazırlanması hedeflenmiştir.

Deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin tasarlanan mikropartikül formülasyonlarının karakterizasyonunda ve özellikle akciğerlere hedeflendirilmesinde önemli iki karakterizasyon ölçütü olan ortalama partikül büyüklüğü ve etkin madde enkapsülasyon etkinliği değerleri üzerindeki etkileri regresyon analizleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bağımlı değişken olarak ortalama partikül büyüklüğü dikkate alınarak yapılan regresyon analizi sonucunda elde edilen denklem aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Partikül büyüklüğü} = & 24,667 - 0,399 A - 3,307 B + 2,781 C - 5,957 D - \\ & 5,963 A*B - 2,066 A*C + 0,432 A*D + 2,834 B*C + 3,299 B*D + 2,044 C*D - \\ & 4,132 A*B*C - 4,387 A*B*D - 2,797 A*C*D + 1,678 B*C*D - 0,698 A*B*C*D - \\ & 5,527 Ct Pt (R^2=0,998) \end{aligned}$$

Denklemden A, lizozim konsantrasyonuna (mg); B, DCM hacmine (ml); C, PVA hacmine (ml) ve D, karıştırma hızına (rpm) ilişkin etkileri göstermektedir. Denklemden katsayılarla ilişkin işaretlerin (+) veya (-) olması sırasıyla bağımsız değişkenlerin, bağımlı değişkenler ile olan pozitif ve negatif yönde ilişkisini açıklamaktadır. Her bir terimin önünde bulunan değerlerin büyüklüğü ise bağımlı değişken üzerine olan etkinin büyüklüğünü ifade etmektedir.

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda bağımsız değişkenlerden lizozim konsantrasyonunun (A) bağımlı değişken olan partikül büyüklüğü üzerine etkisi

anlamsız ($p>0,05$) bulunurken DCM hacmi (B), PVA hacmi (C) ve karıştırma hızının (D) bağımlı değişken olan partikül büyüklüğü üzerine etkisi anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. DCM hacmi (B) ve karıştırma hızının (D) partikül büyüklüğü üzerine etkisi negatif yöndedir ve bu iki bağımsız değişkenin düzeylerindeki artış partikül büyüklüğünde azalmaya yol açmıştır. Organik çözücü hacmi mikropartikül boyutunda kritik bir role sahiptir. Artan çözücü hacmi, dispers faz viskozitesinin azalmasına ve daha küçük damlacıkların oluşmasına neden olmaktadır (Yang ve ark., 2001). Bu nedenle DCM hacmindeki artışın partikül büyüklüğünde azalmaya neden olduğu düşünülmektedir. Karıştırma hızının mikropartiküllerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelendiğinde, daha önce yapılan çalışmalarda da karıştırma hızının artması ile mikropartiküllerin partikül büyüklüğünde azalma olduğu görülmüştür (Diez ve Ilarduya, 2006; Cui ve ark., 2007). Yüksek karıştırma hızı yüksek kayma gücü ve artan türbülans etkisiyle küçük emülsiyon damlacıklarının oluşmasına ve buna bağlı olarak mikropartiküllerin ortalama büyüklüğünde azalmaya neden olmaktadır. PVA hacminin (C) ise partikül büyüklüğü üzerine etkisi pozitif yöndedir ve bu bağımsız değişkenin düzeylerindeki artış partikül büyüklüğünde artış ile sonuçlanmıştır. Jeffery ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (1993) benzer sonuçlar elde etmiş, artan dış faz hacminin partikül büyüklüğünün artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Artan dış faz hacmi nedeniyle görülen karıştırma etkinliğindeki azalma partikül büyüklüğünde artışa neden olmaktadır.

Söz konusu bağımsız değişkenlerin ikili etkileşimleri değerlendirildiğinde lizozim konsantrasyonu ile DCM hacminin ($A*B$), lizozim konsantrasyonu ile PVA hacminin ($A*C$), DCM hacmi ile karıştırma hızının ($B*D$) ve PVA hacmi ile karıştırma hızının ($C*D$) etkileşim etkisi de anlamlı ($p<0,05$) olup lizozim konsantrasyonu ile DCM hacminin ($A*B$) ve lizozim konsantrasyonu ile PVA hacminin ($A*C$) etkileşimi partikül büyüklüğünde azalmaya, DCM hacmi ile karıştırma hızının ($B*D$) ve PVA hacmi ile karıştırma hızının ($C*D$) etkileşimi ise partikül büyüklüğünde artışa neden olmuştur. Bağımsız değişkenlerin üçlü etkileşimlerinin de bağımlı değişken olarak ortalama partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelendiğinde lizozim konsantrasyonu, DCM hacmi ve PVA hacminin ($A*B*C$), lizozim konsantrasyonu, DCM hacmi ve homojenizasyon hızının ($A*B*D$) ve lizozim

konsantrasyonu, PVA hacmi ve homojenizasyon hızının (A*C*D) üçlü etkileşimlerinin de partikül büyüklüğü üzerine etkisi anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Üçlü etkileşimlerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi negatif yönde olup partikül büyüklüğünde azalmaya neden olmuştur.

Faktöriyel tasarımda regresyon analizi sonucunda elde edilen denklemlere ait yüzey-yanıt grafikleri denklemin ifade ettiği ilişkinin uzaydaki profilini göstermektedir. Böylece görsel olarak ilişkinin yönü ve seviyesi görülebilmektedir.

Bağımlı değişken olarak ortalama partikül büyüklüğü dikkate alınarak yapılan regresyon analizi sonucunda elde edilen denklemin yüzey-yanıt grafiğinde de bu ilişki görülmektedir (Şekil 3.6). Bağımsız değişkenler olan lizozim konsantrasyonu, DCM hacmi, PVA hacmi ve karıştırma hızının ortalama partikül büyüklüğü üzerine etkisine ilişkin sonuçların grafiksel gösterimi ise Şekil 3.7’de verilmiştir.

Bağımlı değişken olarak enkapsülasyon etkinliği dikkate alınarak yapılan regresyon analizi sonucunda elde edilen denklem aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Enkapsülasyon Etkinliği} = & 57,811 + 11,948 A + 1,148 B - 5,473 C - 1,732 D - \\ & 1,597 A*B + 3,642 A*C - 2,189 A*D - 0,078 B*C + 0,001 B*D + 1,759 C*D - \\ & 1,326 A*B*C - 1,564 A*B*D + 0,414 A*C*D - 1,301 B*C*D + 1,037 A*B*C*D \\ & + 8,85 Ct Pt (R^2=0,991) \end{aligned}$$

Bağımsız değişkenlerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi incelendiğinde; lizozim konsantrasyonu (A) ve PVA hacminin (C) enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Lizozim konsantrasyonunun (A) enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi pozitif yöndedir ve lizozim konsantrasyonundaki artış enkapsülasyon etkinliğinin artmasını sağlamıştır. Jeffery ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (1993) benzer şekilde mikropartiküllere yüklenen protein (ovalbümin) miktarı ile enkapsülasyon etkinliği arasında doğrusal bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Benzer sonuçlar Feczko ve arkadaşları (2011) tarafından da elde edilmiş, protein

konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. PVA hacminin (C) ise enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi negatif yöndedir ve bu bağımsız değişkenin düzeyindeki artış enkapsülasyon etkinliğinin azalmasına neden olmuştur. DCM hacmi (B) ve karıştırma hızının (D) enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisinin ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür. Söz konusu bağımsız değişkenlerin ikili etkileşimleri değerlendirildiğinde sadece lizozim konsantrasyonu ve PVA hacminin etkileşimi ($A*C$) istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuş olup bu etkileşim enkapsülasyon etkinliğini pozitif yönde etkilemiştir. Bağımsız değişkenlerin üçlü etkileşimlerinin ise enkapsülasyon etkinliği üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bağımlı değişken olarak enkapsülasyon etkinliği dikkate alınarak yapılan regresyon analizi sonucunda elde edilen denklemin yüzey-yanıt grafiğinde de bu ilişki görülmektedir (Şekil 3.9). Bağımsız değişkenler olan lizozim konsantrasyonu, DCM hacmi, PVA hacmi ve karıştırma hızının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisine ilişkin sonuçların grafiksel gösterimi ise Şekil 3.10'da verilmiştir.

4.3. Optimum Mikropartikül Formülasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Optimum mikropartikül formülasyonunun belirlenmesi için, 2^4 full faktöriyel deney tasarımına göre hazırlanan mikropartiküllere ait partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği değerlerinin Minitab Statistical Software 17 analiz programı kullanılarak istatistiksel analizi yapılmıştır. Şekil 3.11'de görüldüğü gibi, etkin madde içeriği yüksek ve akciğerlere hedeflenebilecek kadar küçük partikül büyüklüğüne sahip optimum mikropartikül formülasyonlarının hazırlanması için lizozim konsantrasyonu, DCM hacmi ve karıştırma hızının yüksek seviyede (1), PVA hacminin ise düşük seviyede (-1) olması gerekmektedir. Bu sonuçlardan hareketle optimum mikropartikül formülasyonunun lizozim konsantrasyonu 10 mg, DCM hacmi 5 ml, PVA hacmi 20 ml ve karıştırma hızı 13500 rpm olduğunda elde edilebileceği öngörülmüştür.

Belirlenen formülasyon parametreleri ile hazırlanan optimum formülasyona ait partikül büyüklüğü, span, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri incelendiğinde bu formülasyon parametreleri ile 9,82 μm partikül büyüklüğüne, 2,80 span değerine, (-17,20) mV zeta potansiyeline ve %75,70 enkapsülasyon etkinliğine sahip mikropartiküllerin elde edildiği görülmektedir (Çizelge 3.15).

4.4. FTIR Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Lizozim içeren mikropartiküllerin yapısal bileşimini belirlemek için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla lizozimin, PCL'un, PVA'nın ve lizozim yüklü mikropartiküllerin FTIR spektrumları alınmıştır (Şekil 3.12). Lizozimin FTIR spektrumunda bulunan 1638.2 ve 1522.6 cm^{-1} pikler (Şekil 3.12a) amid I ve amid II gruplarına aittir (Van de Weert ve ark., 2000). PCL'un 2942.7 cm^{-1} 'deki piki hidroksil, 1720.2 cm^{-1} 'deki keskin piki (Şekil 3.12b) ise ester grubuna aittir (Liverani ve ark., 2014). Lizozim yüklü mikropartiküllerin FTIR spektrumuna (Şekil 3.12c) bakıldığında ise serbest haldeki lizozimin amid I ve amid II gruplarına ait 1638.2 ve 1522.6 cm^{-1} 'deki bantların 1636.3 ve 1518.9 cm^{-1} 'de olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar mikropartiküllere yüklenen lizozimin yapısını koruduğunu ve polimerle etkileşmediğini göstermektedir.

4.5. DSC Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Lizozimin mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerle etkileşimini incelemek için DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla lizozimin, PCL'un ve lizozim yüklü mikropartiküllerin DSC termogramlarının karşılaştırması yapılmıştır (Şekil 3.13). PCL'un DSC termogramı incelendiğinde, 60,72 $^{\circ}\text{C}$ 'de keskin bir endotermik pike sahip olduğu görülmektedir. DSC termogramındaki bu endotermik pikin PCL'un erime noktasına ait olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur (Kerman ve ark., 2005; Jana ve ark., 2014). Lizozimin DSC termogramında 79,33 $^{\circ}\text{C}$ 'de yer alan geniş ekzotermik pik ve

dekompozisyon başlangıcını gösteren 203,90°C'deki ekzotermik pik literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur (Bye ve Falconer, 2013; Cao ve ark., 2016). Lizozim yüklü mikropartiküllerin termogramında görülen 58,46°C'deki ekzotermik pikin PCL'a ait olduğu düşünülmektedir. Mikropartiküllere ait termogramda lizozime ait herhangi bir pikin görülmemesinin formülasyon içindeki düşük lizozim miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.6. Mikropartiküllerin SEM Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Optimum mikropartikül formülasyonunun morfolojisini belirlemek amacıyla Bölüm 2.2.7.7'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen SEM analizine ait görüntüler Şekil 3.14'te verilmiştir. Lizozim yüklü mikropartiküllerin SEM fotoğraflarına bakıldığında küresel şekle sahip oldukları ve yüzeylerinin düzgün olduğu gözlenmiştir.

4.7. Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi

Optimum mikropartikül formülasyonuna ait lizozim salım profili % 0,01 SDS içeren pH 7,4 fosfat tamponunda incelenmiştir. Elde edilen salım profili Şekil 3.15'te sunulmuştur. Elde edilen çözünme hızı grafiğine bakıldığında, mikropartiküllerin bifazik salım profiline sahip oldukları görülmektedir. Hazırlanan mikropartikül formülasyonlarında, başlangıçta (ilk 8 saatte) hızlı bir etkin madde çıkışı elde edilmiştir (Sandor ve ark., 2001; Lagarce ve ark., 2006). Başlangıçtaki bu hızlı çıkışın etkin maddenin mikropartikül içinde heterojen dağılım göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mikropartikül yüzeyine zayıfça tutunmuş ya da yüzeye yakın kısımlarda lokalize olmuş proteinler bu hızlı çıkışa neden olmaktadır (Rafati ve ark., 1997; Barakat ve Radwan, 2006; Yin ve ark., 2006; Araújo ve ark., 2009). Başlangıçtaki hızlı salım aşamasını etkin madde çıkışının yavaş olduğu salım fazı takip etmektedir. Bu aşamadaki etkin madde salım hızının yavaş olmasına polimer matrise

güçlü bir şekilde bağlanmış olan proteinlerin neden olduğu düşünülmektedir (Aubert-Pouëssel ve ark., 2004; Giteau ve ark., 2008).

Çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirmesi sıfır derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Rosin-Rammler-Sperling-Bennet-Weibull (RRSBW) ve Hixson-Crowell kinetiklerine göre gerçekleştirilmiş ve yapılan değerlendirmelere ait sonuçlar Çizelge 3.16'da verilmiştir. Optimum formül için elde edilen verilere bakıldığında en yüksek r^2 değerinin RRSBW ile (0,950) elde edildiği görülmüştür. RRSBW için RMS değerinin de oldukça düşük olduğu (0,004) gözlenmiştir. Weibull kinetiğinde hesaplanan β değerinin 1'den küçük olması başlangıçtaki hızlı etkin madde salımının ardından birinci derece kinetiğe benzer şekilde platoya ulaştığını, parabolik bir çözünme hızı profili elde edildiğini göstermektedir (Costa ve ark., 2013). Korsmeyer-Peppas denkleminde hesaplanan n değerinin 1'den küçük olması ise, etkin maddenin mikropartiküllerden çıkışının Fick yasasına uymayan (Non-Fickian) bir difüzyon mekanizmasına sahip olduğunu göstermektedir (Ayhan ve Ayhan, 2014).

4.8. SDS-PAGE Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda, mikropartiküllerden ekstrakte edilen ve salınan lizozimin yapısal bütünlüğünü koruyup korumadığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır (Nikfarjam ve ark., 2020).

Çalışmamızda molekül ağırlığı ~14 kDa olan lizozim kullanılmıştır. Elde edilen jel görüntüsüne bakıldığında (Şekil 3.16) standart lizozim çözeltilerine ait bantların 10-120 kDa molekül ağırlığına sahip referans protein karışımına ait bantlardan 14.4 kDa molekül ağırlığına sahip proteine ait bant ile çakıştığı ve bant yoğunluklarının lizozim konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmüştür. Standart lizozim çözeltilerine ait line'larda daha yüksek protein ağırlığına sahip bantların görülmesi SDS-PAGE işlemi sırasında uygulanan ısıtma işlemine bağlı olarak agregat oluşumundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Nikfarjam ve ark., 2020). Mikropartiküllerden ekstrakte edilen ve salınan lizozime ait bantların ise standart lizozim çözeltilerine ait bantlar ile aynı

seviyede olması mikropartiküllerden ekstrakte edilen ve salınan lizozimin yapısal bütünlüğünü koruduğunu göstermiştir.

4.9. Mikropartiküllerin Stabilitesinin Değerlendirilmesi

Optimum mikropartikül formülasyonunun kısa süreli stabilitesinin belirlenmesi için buzdolabında (2-8 °C) 6 ay süreyle bekletilen mikropartiküllerin partikül büyüklüğü, span ve zeta potansiyeli değerleri belirlenmiştir. Buzdolabında 6 ay boyunca bekletilen mikropartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü değerleri başlangıç partikül büyüklüğü değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmektedir. Benzer şekilde span değerlerinde de anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Zeta potansiyeli değerlerine bakıldığında da mikropartiküllerin zeta potansiyelinde anlamlı bir değişim görülmemiştir (Çizelge 3.17). Tüm bu sonuçlar mikropartiküllerin buzdolabında 6 ay boyunca stabilitelerinin korunduğunu göstermiştir.

4.10. Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

İnhale edilen partiküllerin aerodinamik özellikleri akciğerlerde başarılı bir şekilde tutulmalarında önemli rol oynamaktadır (Devrim ve ark., 2011b). Genellikle KOAÇ değeri 10 µm'den yüksek olan partiküller orofarinkste, 5-10 µm arasında olanlar merkezi solunum yollarında ve 0,5-5 µm arasında olanlar küçük hava yollarında ve alveollerde birikirler. Bu nedenle lokal solunum yolu hastalıklarının tedavisi için partiküllerin 5 µm ya da daha küçük KOAÇ değerine sahip olması istenmektedir (Tena ve Clara, 2012). Seçtiğimiz mikropartikül formülasyonunun pulmoner veriliş için uygun kriterlere sahip olup olmadığının belirlenmesi için sekiz aşamalı Andersen cihazı kullanılarak KOAÇ değeri belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda mikropartiküllerin KOAÇ değeri 5,44±0,18 µm olarak bulunmuştur (Çizelge 3.18). İnhale edilen partiküllerin aerodinamik özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan bir diğer önemli parametre ise İPF'dur. Bu değer 5

μm ve daha küçük partikül büyüklüğüne sahip partiküllerin yüzdesini ifade etmektedir. Seçilen mikropartikül formülasyonunun İPF değeri ise $\%50,99 \pm 2,89$ olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar hazırlanan mikropartikül formülasyonlarının inhalasyon yolu ile etkin bir şekilde uygulanabileceğini göstermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kistik fibrozis tedavisinde inhalasyon yolu ile uygulanmak üzere lizozim içeren mikropartiküllerin hazırlanmasını ve değerlendirilmesini hedefleyen bu çalışmada;

- Lizozimin sudaki çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle mikropartikül formülasyonları s/y/s emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır.

-Mikropartiküler sistemlerin hazırlanmasında polimer olarak biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu bir polimer olması nedeniyle PCL kullanılmıştır. Dış sulu fazda dispersiyon ajanı olarak Pluronic F68'in kullanıldığı formülasyonlarda agregat oluşmuş ve küresel mikropartiküller elde edilememiştir. Bu nedenle dış sulu fazda dispersiyon ajanı olarak Tween 60 kullanılarak mikropartiküller hazırlanmaya çalışılmıştır. Ancak bu formülasyonda da mikropartiküller elde edilememiştir. Dış sulu fazda dispersiyon ajanı olarak PVA'nın kullanıldığı formülasyonda ise mikropartikül oluşumu gerçekleştiği ve agregat oluşumu gözlenmediği için dış sulu faz olarak PVA çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir.

- Mikropartiküllerin hazırlanmasında uygulanan formülasyon parametrelerinin ürün kalitesini nasıl etkilediğini belirlemek için 2^4 full faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Kullanılan deney tasarımında bağımsız değişken olarak lizozim miktarı (mg), DCM hacmi (ml), PVA hacmi (ml) ve homojenizasyon hızı (rpm) seçilmiştir.

-Deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin tasarlanan mikropartikül formülasyonlarının karakterizasyonunda ve özellikle akciğerlere hedeflendirilmesinde önemli iki karakterizasyon ölçütü olan ortalama partikül büyüklüğü ve etkin madde enkapsülasyon etkinliği değerleri üzerindeki etkileri regresyon analizleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda bağımsız değişkenlerden lizozim konsantrasyonunun bağımlı değişken olan partikül büyüklüğü üzerine etkisi anlamsız ($p>0,05$) bulunurken DCM hacmi, PVA hacmi ve

karıştırma hızının bağımlı değişken olan partikül büyüklüğü üzerine etkisi anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Bağımsız değişkenlerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi incelendiğinde; lizozim konsantrasyonu ve PVA hacminin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. Lizozim konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi pozitif yöndedir ve lizozim konsantrasyonundaki artış enkapsülasyon etkinliğinin artmasını sağlamıştır. PVA hacminin ise enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi negatif yöndedir ve bu bağımsız değişkenin düzeyindeki artış enkapsülasyon etkinliğinin azalmasına neden olmuştur. DCM hacmi ve karıştırma hızının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisinin ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür. Söz konusu bağımsız değişkenlerin ikili etkileşimleri değerlendirildiğinde sadece lizozim konsantrasyonu ve PVA hacminin etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuş olup bu etkileşim enkapsülasyon etkinliğini pozitif yönde etkilemiştir.

-2⁴ full faktöriyel deney tasarımı sonucunda etkin madde içeriği yüksek ve akciğerlere hedeflenebilecek kadar küçük partikül büyüklüğüne sahip optimum mikropartikül formülasyonlarının lizozim konsantrasyonu 10 mg, DCM hacmi 5 ml, PVA hacmi 20 ml ve karıştırma hızı 13500 rpm olduğunda elde edilebileceği öngörülmüştür.

- Lizozim içeren mikropartiküllerin yapısal bileşimini belirlemek için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar mikropartiküllere yüklenen lizozimin yapısını koruduğunu ve polimerlerle etkileşmediğini göstermiştir.

- Lizozimin mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerle etkileşimini incelemek için DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Lizozimin DSC termogramında 79,33 °C’de yer alan geniş ekzotermik pik ve dekompozisyon başlangıcını gösteren 203,90°C’deki ekzotermik pikin mikropartiküllere ait termogramda görülmemesinin formülasyon içindeki düşük lizozim miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

- Optimum mikropartikül formülasyonunun morfolojisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen SEM analizine ait görüntüler mikropartiküllerin küresel şekle sahip olduklarını ve yüzeylerinin düzgün olduğunu göstermiştir.

- Optimum mikropartikül formülasyonu için % 0,01 SDS içeren pH 7,4 fosfat tamponunda incelenen salım profili mikropartiküllerin bifazik salım profiline sahip olduklarını göstermiştir. Mikropartikül yüzeyine zayıfça tutunmuş ya da yüzeye yakın kısımlarda lokalize olmuş proteinler başlangıçta hızlı bir etkin madde çıkışına neden olmuştur. Başlangıçtaki hızlı salım aşamasını etkin madde çıkışının yavaş olduğu salım fazı takip etmiştir. Bu aşamadaki etkin madde salım hızının yavaş olmasının polimer matrise güçlü bir şekilde bağlanmış olan proteinlerden kaynaklandığı düşünülmüştür.

- Çözünme hızı verilerinin kinetik değerlendirmesi sıfır derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Rosin-Rammler-Sperling-Bennet-Weibull (RRSBW) ve Hixson-Crowell kinetiklerine göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda en yüksek r^2 değerinin RRSBW ile elde edildiği görülmüştür. RRSBW kinetiğinde hesaplanan β değerinin 1'den küçük olması başlangıçtaki hızlı etkin madde salımının ardından birinci derece kinetiğe benzer şekilde platoya ulaştığını ve parabolik bir çözünme hızı profili elde edildiğini göstermiştir. Korsmeyer-Peppas denkleminde göre hesaplanan n değerinin 1'den küçük olması ise, etkin maddenin mikropartiküllerden çıkışının Fick yasasına uymayan (Non-Fickian) bir difüzyon mekanizmasına sahip olduğunu göstermiştir.

- Mikropartiküllerden ekstrakte edilen ve salınan lizozimin yapısal bütünlüğünü koruyup korumadığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Mikropartiküllerden ekstrakte edilen ve salınan lizozime ait bantların standart lizozim çözeltilerine ait bantlar ile aynı seviyede olması mikropartiküllere yüklenen ve mikropartiküllerden salınan lizozimin yapısal bütünlüğünü koruduğunu göstermiştir.

- Optimum mikropartikül formülasyonunun kısa süreli stabilitesinin belirlenmesi için buzdolabında (2-8 °C) 6 ay süreyle bekletilen mikropartiküllerin partikül

büyükülüğü, span ve zeta potansiyeli değerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar mikropartiküllerin buzdolabında 6 ay boyunca stabilitelerini koruduğunu göstermiştir.

- Seçtiğimiz mikropartikül formülasyonunun pulmoner veriliş için uygun kriterlere sahip olup olmadığının belirlenmesi için sekiz aşamalı Andersen cihazı kullanılarak yapılan değerlendirmede mikropartiküllerin KOAÇ değeri $5,44 \pm 0,18 \mu\text{m}$, İPF değeri ise $\%50,99 \pm 2,89$ olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar hazırlanan mikropartikül formülasyonlarının inhalasyon yolu ile etkin bir şekilde uygulanabileceğini göstermektedir.

- Sonuç olarak; inhalasyon yolu ile uygulanan lizozim yüklü mikropartiküllerin akciğerlere ulaşarak antimikrobiyal etkinliğinden faydalanmayı ve hastaların antibiyotik yükünün azaltılmasını hedefleyen bu çalışmada elde edilen sonuçlar hazırlanan mikropartikül formülasyonlarının inhalasyon yolu ile etkin bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir.

-Bu çalışmanın devamında optimum özelliklere sahip olduğu belirlenen mikropartikül formülasyonlarının kistik fibroze neden olan mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi planlanmaktadır.

ÖZET

Lizozim İçeren Mikropartiküllerin İnhalasyon Formülasyonlarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Kistik fibrozis (KF) kalıtsal bir hastalıktır. KF'e neden olan genetik değişiklik nedeni ile KF'li hastalarda vücuttaki bütün salgılar susuz, koyulaşmış ve yoğun kıvamda olup akışkan özelliği kaybolmuştur. Bu nedenle; akciğer, karaciğer, pankreas ve bağırsaklar gibi organların kanallarında salgılar birikerek tıkanmaya, enfeksiyonlara ve hasara neden olmaktadır. KF'li bireylerin akciğerlerinde erken yaşlarda en sık stafilokok (*Staphylococcus aureus*) ve *Haemophilus influenzae*, ilerleyen yaşlarda ise psödomonas (*Pseudomonas aeruginosa*) ile enfeksiyonlar gelişmektedir. Başta psödomonas ve stafilokoklar olmak üzere mikroorganizmaların solunum yollarına yerleşmesi bu mikroorganizmaların kronik kolonizasyonuna neden olmaktadır. Akciğerlerde başlangıçtaki mukoid olmayan tiplerle geçici psödomonas kolonizasyonunun yerini, tedavi edilmeyen bireylerde daha sonra aljinat örtüsü ile kaplı mukoid koloniler ile kalıcı, kronik psödomonas kolonizasyonu almaktadır. Kronik psödomonas enfeksiyonlarında, mikroorganizmaların solunum sisteminden tam olarak temizlenmesi mümkün olmaz. Bu nedenle KF'li bireylerde psödomonasın solunum yollarında ilk kez saptandığı erken dönemde, mukoid kolonilere dönmeden uzun süreli antibiyotik tedavisi ile yok edilmesi çok önemlidir. Bununla birlikte, uzun süreli antibiyotik kullanımına bağlı olarak pek çok mikroorganizmada artan bir antibiyotik direnç sorunu ile karşılaşmaktadır. Klasik antibiyotiklere karşı direnç gelişimindeki artış, enfeksiyöz patojenlere karşı etkili yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi gerekliliğini gündeme getirmiştir. Bağışıklık sisteminin temel bileşenleri olan antimikrobiyal peptitler ve proteinler antibiyotiklere alternatif olarak düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, inhalasyon yolu ile uygulanmak üzere KF'deki enfeksiyon etkenlerine karşı etkili lizozim içeren mikropartiküler sistemler geliştirmek ve değerlendirmektir. Antimikrobiyal etkili bir protein olan lizozim, klasik antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmıştır. Lizozimin stabilitesini korumak, akciğerlere etkili bir şekilde taşınmasını sağlamak ve salım hızını kontrol edebilmek amacıyla biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer olan polikaprolakton (PCL) kullanılarak mikropartikülleri hazırlanmıştır. Lizozim suda çözünen bir protein olduğu için mikropartiküllerinin hazırlanmasında su içinde yağ içinde su (s/y/s) tipi emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan mikropartiküllerde partikül büyüklüğü ve dağılımı, morfolojisi, yükleme etkinliği, üretim verimi ve çözünme hızı deneyleri gerçekleştirilmiştir. Optimum özelliklere sahip mikropartiküllerin belirlenmesi için 2⁴ full faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır. Belirlenen optimum mikropartikül formülasyonunun aerodinamik özellikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar lizozim içeren PCL mikropartiküllerinin akciğerlerde etkin bir şekilde tutulabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak; KF tedavisinde lizozim içeren PCL mikropartiküllerinin pulmoner verilmiş için etkin bir dozaj formu olarak değerlendirilebileceği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Akciğerlere Hedefleme, İnhalasyon, Kistik Fibrozis, Lizozim, Mikropartikül

SUMMARY

Preparation and Evaluation of Inhalation Formulations of Lysozyme Containing Microparticles

Cystic fibrosis (CF) is an inherited disease. Due to the genetic change that causes CF, all secretions in the body are dehydrated, darkened and have a dense consistency, and their fluidity is lost in patients with CF. Because; secretions accumulate in the channels of organs such as the lungs, liver, pancreas and intestines, causing obstruction, infections and damage. In the lungs of individuals with CF, infections with staphylococci (*Staphylococcus aureus*) and *Haemophilus influenzae* most frequently develop in early ages, and with *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*) in later ages. The settlement of microorganisms, especially *Pseudomonas* and staphylococci, in the respiratory tract causes chronic colonization of these microorganisms. Initial transient *Pseudomonas* colonization of the lungs with non-mucoid types is replaced by persistent, chronic *Pseudomonas* colonization in untreated individuals, with later mucoid colonies covered with an alginate mantle. In chronic *Pseudomonas* infections, it is not possible to completely clear the microorganisms from the respiratory system. Therefore, in the early period when *Pseudomonas* is detected in the respiratory tract for the first time in individuals with CF, it is very important to eradicate it with long-term antibiotic therapy before it returns to mucoid colonies. However, an increasing problem of antibiotic resistance is encountered in many microorganisms due to long-term use of antibiotics. The increase in the development of resistance against classical antibiotics has brought up the necessity of developing new antimicrobial agents effective against infectious pathogens. Antimicrobial peptides and proteins, which are essential components of the immune system, are considered as alternatives to antibiotics.

The aim of this study is to develop and evaluate microparticulate systems containing lysozyme effective against infectious agents in CF for inhalation administration. Lysozyme, an antimicrobial effective protein, has been used as an alternative to classical antibiotics. Microparticles of lysozyme were prepared using polycaprolactone (PCL), a biocompatible and biodegradable polymer, in order to maintain the stability of the lysozyme, ensure its efficient transport to the lungs and control the release rate. Since lysozyme is a water-soluble protein, water-in-oil (w/o) type emulsion solvent evaporation method was used in the preparation of its microparticles. Particle size and distribution, morphology, loading efficiency, production efficiency and dissolution rate experiments were carried out in the prepared microparticles. 2⁴ full factorial experimental designs were used to determine microparticles with optimum properties. The aerodynamic properties of the determined optimum microparticle formulation were evaluated. The results showed that PCL microparticles containing lysozyme can be effectively retained in the lungs.

As a result; It has been observed that PCL microparticles containing lysozyme can be evaluated as an effective dosage form for pulmonary administration in the treatment of CF.

Keywords: Cystic Fibrosis, Inhalation, Lysozyme, Microparticle, Targeting to Lungs

KAYNAKLAR

- AİSHWARYA S, MAHALAKSHMI S, SEHGAL PK (2008). Collagen-coated polycaprolactone microparticles as a controlled drug delivery system. *Journal of Microencapsulation*, **5**: 298–306.
- ARAÚJO J, VEGA E, LOPES C, EGEA MA, GARCIA M L, SOUTO E B (2009). Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **72**: 48-56.
- AUBERT PA, VENIER-JULIENNE MC, CLAVREU A, SERGENT M, JOLLIVET C, MONTERO-MENEI CN, GARCION E, BIBBY DC, MENEI P, BENOIT J P. (2004). In vitro study of GDNF release from biodegradable PLGA microspheres. *J. Control. Release* **95**: 463-475.
- AYHAN H, AYHAN F (2014). Kontrollu ilaç salımı için fotoçapraz bağlı poli (etilen glikol) hidrojeller. *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, **39(4)**: 403–415
- BAKAND S, HAYES A (2016). Toxicological considerations, toxicity assessment, and risk management of inhaled nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, **17(6)** : 929
- BARAKAT N S, RADWAN M A (2006). In vitro performance of carbamazepine loaded to various molecular weights of poly(d,l-lactide-co-glycolide). *Drug Deliv.* **13**: 9-18.
- BALE S, KHURANA A, REDDY AS, SINGH M, GODUGU C (2016). Overview on therapeutic applications of microparticulate drug delivery systems. *Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems*, **33(4)** : 309–361.
- BERKENFELD K, LAMPRECHT A, MCCONVILLE JT (2015). Devices for dry powder drug delivery to the lung. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, **16(3)** : 479-490.
- BHAVSAR T, LIU M, HARDEJ D, LIU X, CANTOR J (2010). Aerosolized recombinant human lysozyme ameliorates *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in hamsters. *Experimental Lung Research*, **36**:94–100
- BHAVSAR T, LIU M, LIU X, CANTOR J (2011). Aerosolized recombinant human lysozyme enhances the bactericidal effect of tobramycin in a hamster model of *pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia. *Experimental Lung Research*, **37**:9, 536-541.
- BRAMBILLA G, GANDERTON D, GARZIA R, LEWIS D, MEAKIN B, VENTURA P (1999). Modulation of aerosol clouds produced by pressurised inhalation aerosols. *International Journal of Pharmaceutics*, **186**: 53-61

- BYE JW, FALCONER RJ (2013). Thermal stability of lysozyme as a function of ion concentration: a reappraisal of the relationship between the Hofmeister series and protein stability. *Protein Sci.* ; **22 (11)** :1563-1570.
- DEVİRİM B, BOZKIR A, CANEFE K (2011). Preparation and evaluation of poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles as a carrier for pulmonary delivery of recombinant human interleukin-2: II. In vitro studies on aerodynamic properties of dry powder inhaler formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **37**:11, 1376-1386.
- CARVALHO TC, MCCONVILLE JT (2016). The function and performance of aqueous aerosol devices for inhalation therapy. *Journal of Pharmacology and Pharmacy*, **68 (5)** :556-578
- CAO XM, TIAN Y, WANG ZY, LIU Y W, WANG CX (2016). Effects of protein and phosphate buffer concentrations on thermal denaturation of lysozyme analyzed by isoconversional method. *Bioengineered*, **7:4**, 235-240).
- CUI C, STEVENS VC, SCHWENDEMAN SP (2007). Injectable polymer microspheres enhance immunogenicity of a contraceptive peptide vaccine. *Vaccine*, **25**:500–509.
- COATES MS, CHAN HK, FLETCHER DF, RAPER JA (2005). Influence of air flow on the performance of a dry powder inhaler using computational and experimental analyses. *Pharmaceutical Research*, **22 (9)** : 1445-1453
- COSTA ALDO, ENEAS PCR, MIRANDA TA, MINGOTI SA, SOARES CDV, PIANETTI GA (2013). In vitro dissolution kinetic for mycophenolic acid derivatives tablets. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **49.2**: 311-319.
- COUVREUR P, BLANCO-PRIETO M J, PUISIEUX F, ROQUES B, FATTAL E (1997). “ Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides” *Advanced Drug Delivery Rev.* **28**: 85-96
- D' ANGELO I, CONTE C, LA ROTONDA M I, MİRO A, QUAGLIA F, UNGARO F (2014). Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: Challenges and emerging drug delivery strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **75**, 92– 111.
- DIEZ S, CONCHITA TDI , (2006). Versatility of biodegradable poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres for plasmid DNA delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **63**:188-197.
- DÖRİNG G, HOİBY N, Consensus Study Group (2004). Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: A European Consensus. *Journal of Cystic Fibrosis*, **3**: 67-91.
- ERDOĞAN S (2014). Nanolipozomlar. *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*, 53-60, İstanbul: Aktif Matbaa Ve Reklam Hiz San Tic A.Ş.

- FLAMENT MP, LETERME P, GAYOT A (1999). Influence of the technological parameters of ultrasonic nebulisation on the nebulisation quality of alpha 1 protease inhibitor (alpha1PI). *International journal of Pharmaceutics*, **189**: 197-204.
- FREDERIKSEN B, KOCH C, HOIBY N. (1997). Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonology*, **23**: 330-5.
- FREITAS S, MERKLE HP, GANDER B. (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microspheres preparation process technology. *Journal of Control Release*, **102**: 313-332
- FRIJLINK HW, DE BOER AH, (2007). Nebulization and administration devices. In :*Pulmonary Drug Delivery*, Ed.: K. Bechtold-Peters, H. Luessen. Stuttgart: Druckerei Marquart GmbH, Chapter III.
- GABRIO BJ, STEIN SW, VELASQUEZ DJ (1999). A new method to evaluate plume characteristics of hydrofluoroalkane and chlorofluorocarbon metered dose inhaler. *International Journal of Pharmaceutics*, **186**: 3-12.
- GHOSH A, ALI M A, SELVANESAN L, DIAS JG (2010). Structure-function characteristics of the biomaterials based on milk-derived proteins. *International journal of biological macromolecules*, **46**:404–411.
- GIBSON RL, BURNS JL, RAMSEY BW (2003). Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **168**: 918-51.
- GITEAU A, VENIER-JULIENNE MC, AUBERT-POUESSEL A, BENOIT JP (2008). “ How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?” *Int. J. Pharm.* **350**: 14-26.
- GRUMEZESCU V, HOLBAN AM, SIMA LE, CHIRITOIU MB, CHIRITOIU GN, GRUMEZESCU A M, IVAN L, SAFCIUC F, ANTOHE F, FLORICA C, LUCULESCU CR, CHIFIRIUC MC, SOCOL G. (2017) . Laser deposition of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) - lysozyme microspheres based coatings with anti-microbial properties. *International journal of pharmaceutics*, **521**(1-2), 184–195.
- HANCOCK REW, SPEERT DP (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, **3**(4): 247–255.
- HANSEN CR, PRESSLER T, HOIBY N (2008). Early aggressive eradication therapy for intermittent *Pseudomonas aeruginosa* airway colonisation in CF patients: 15 years experience. *Journal of cystic fibrosis* **7**: 523-30.

- HERRMANN J, BODMEIER R (1998). Biodegradable somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **45**: 75-82.
- HOİBY N, FREDERİKSEN B, PRESSLER T (2005). Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of cystic fibrosis* ; **4**: 49-54.
- HONG S, KİM G (2011). Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers* ;**83**:940–946.
- İBRAHİM HR, TAKAYOSHİ AOKİ T, PELLEGRİNİ A, (2002). Strategies for New Antimicrobial Proteins and Peptides: Lysozyme and Aprotinin as Model Molecules. *Current Pharmaceutical Design*, **8**, 671-693.
- JANA S, LEUNG M, CHANG J, ZHANG M. (2014). Effect of nano- and micro-scale topological features on alignment of muscle cells and commitment of myogenic differentiation. *Biofabrication* ;**6** (3):035012.
- JEFFERY H, DAVIS SS, O'HAGAN DT (1993). The Preparation and Characterization of Poly(lactide-co-glycolide) Microparticles. II. The Entrapment of a Model Protein Using a (Water-in-Oil)-in-Water Emulsion Solvent Evaporation Technique. *Pharmaceutical Research* **10**, 362–368
- KAŞ H S (2002). İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. Kontrollü Salım Sistemler. Ed.: A. Z. Gürsoy, İstanbul: Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., Bölüm 4.
- KERMAN I, TOPPARE L, YILMAZ F, YAGCI Y (2005). Thiophene Ended ϵ -Caprolactone Conducting Copolymers and their Electrochromic Properties. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. **42**. 509-520.
- LAGARCE F, GARCION E, FAISANT N, THOMAS O, KANAUIA P, MENEI P, BENOIT J P. (2006). Development and chracterization of interleukin-18 loaded biodegradable microspheres. *Int. J. Pharm.* **314**: 179-188.
- LEE WH, LOO CY, TRAİNİ D, YOUNG PM (2015). Inhalation of nanoparticle-based drug for lung cancer treatment: advantages and challenges. *Asian Journal of pharmaceutical sciences*, **10**(6):481–9.
- LİVERANİ L, LACİNA J, ROETHER JA, BOCCARDİ E, KİLLİAN MS, SCHMUKİ P, SCHUBERT DW, BOCCACCİNİ AR. Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun PCL/chitosan fibers by using benign solvents. *Bioactive Materials*, Volume **3**, Issue **1**, 2018, Pages 55-63.
- LİSTER PD, WOLTER DJ, HANSON ND, (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded re-sistance mechanism. *Clinical microbiology reviews*, **22**, 582–610.

- LOBO J, ROJAS BALCAZAR JM, NOONE PG (2012). Recent advances in cystic fibrosis. *Clinics in chest medicine*, **33(2)**, 307–328.
- MALIKMAMMADOV E, TANIR T E, KIZILTAY A, HASIRCI V, HASIRCI N (2018). PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science Polymer edition*, **29(7-9)**, 863–893.
- MENG FT, MA GH, QIU W, SU ZG (2003). w/o/w double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of controlled release*, **91**: 407-4
- MOGHADDAM MM, AGHAMOLLAËI H, KOOSHKI H, BARJINI KA, MIRNEJAD R, CHOOPANI A (2015). The development of antimicrobial peptides as an approach to prevention of antibiotic resistance. *Reviews in Medical Microbiology*, **26**:98–110
- MOGHADDAM MM, BARJINI KA, RAMANDI MF, AMANI J (2014). Investigation of the antibacterial activity of a short cationic peptide against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium* strains and its cytotoxicity on eukaryotic cells. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*; **30**:1533–1540.
- MOSS RB (2002). Long-term benefits of inhaled tobramycin in adolescent patients with cystic fibrosis *Chest*; **121**: 55-63.
- MUNCK A, BONACORSI S, MARIANI-KURKDJIAN P, LEBOURGEOIS M, GÉRARDIN M, BRAHIMI N, NAVARRO J, BINGEN E (2001). Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. *Pediatric Pulmonology* ; **32**: 288-92.
- MYRDAL P B, SHETH P, STEIN S W. (2014). Advances in metered dose inhaler technology: formulation development. *American Association of Pharmaceutical Scientists*; **5(2)**:434-455.
- O'CALLAGHAN C., BARRY P W (1997). The science of nebulised drug delivery. *Thorax* **42**(Suppl.2): 31-44
- NIK FARJAM S, JOURAVLEVA E, ANISIMOV M, WOHL T (2020). Effects of Protein Unfolding on Aggregation and Gelation in Lysozyme Solutions. *Biomolecules* **2020**; **10(9)**:1262.
- PANG Z, RAUDONIS R, GLICK BR, LIN TJ, CHENG Z (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, **37(1)**, 177–192.
- PULIVENDALA G, BALE S, GODUGU C (2020). Inhalation of sustained release microparticles for the targeted treatment of respiratory diseases. *Drug delivery and translational research*, **10(2)**, 339–353.

- RAFATI H, LAVELLE E C, COOMBES A G, STOLNIK S, HOLLAND J, DAVIS SS (1997). The immune response to a model antigen associated with PLG microparticles prepared using different surfactants. *Vaccine* **15(17-18)**: 1888-1897.
- RATJEN F, MUNCK A, KHO P, ANGYALOSI G (2010). Treatment of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: the *ELITE trial*. *Thorax*, **65**: 286-91.
- RİORDAN JR (2008). CFTR function and prospects for therapy. *Annual review of biochemistry*. **77**: 701-26
- SADİKOT RT, BLACKWELL TS, CHRISTMAN JW, PRINCE AS.(2005) Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*; **171**:1209-23
- SAİMAN L. (2004). Microbiology of early CF lung disease. *Paeditric Respiratory Reviews* ; **5(1)**, 367-9.
- SANDOR M, ENSCORE D, WESTON P, MATHIOWITZ E. (2001). Effect of protein molecular weight on release from micron-sized PLGA microspheres. *J. Control. Release* **76**: 297-311.
- SEO MD, WON HS, KİM JH, MİSHİG OT, LEE BJ (2012). Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules* ;**17**:12276–12286.
- ŞENEL S (2014). Nanotaşıyıcılarda Kullanılan Polimerler. A. Zırh-Gürsoy içinde, Nanofarmasötikler ve Uygulamaları. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği. S 9-22.
- SHAİ Y (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Peptide Science*; **66**:236–248.
- SİDDİQUİ N, ASAWA S, BİRRU B, BAADHE R, RAO S. (2018). PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Molecular biotechnology*, **60 (7)**, 506–532
- SMITHA I J, PARRY B M (2003). “ The inhalers of the future? A review of dry powder devices on the market today.” *Pulmonary pharmacology and therapeutics* **16**: 79–95.
- TAYLOR K (2002).Pulmonary drug delivery. In: *Pharmaceutics, The Science of Dosage Form Design. Ed.: M. E. Aulton. Spain: Elsevier Limited, Chapter 31*
- TELKO MJ, HICKEY AJ (2005). Dry powder inhaler formulation. *Respiratory Care*, **50(9)**:1209-1227.
- THİBAUDEAU L, TAUBENBERGER AV, HOLZAPFEL BM, QUENT VM, FUEHRMANN T, HESAMİ P, BROWN TB, DALTON PD, POWER AC, HOLLİER BG, HUTMACHER WD (2014). A tissue-engineered humanized

xenograft model of human breast cancer metastasis to bone. *Disease Model Mechanisms* ;7:299–309

Türk Toraks Derneği Kistik Fibrozis Tanı Ve Tedavi Rehberi, 2011.

TU J Y, INTHAVONG K, AHMADI G (2013) . Fluid Particle Dynamics in the Human Respiratory System – A Computational Approach. *Biological And Medical Physics, Biomedical Engineering*

FECZKÓ T, TÓTH J, DÓSA G, GYENİS J (2011). Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* Volume 50, Issue 8, August 2011, Pages 757-765

VAN DE WEERT M, VAN 'T HOF R, VAN DER WEERD J, HEEREN MAR, POSTHUMA G, HENNINK WE, CROMMELIN DJA. Lysozyme distribution and conformation in a biodegradable polymer matrix as determined by FTIR techniques. *Journal of Controlled Release*, Volume 68, Issue 1, 2000, Pages 31-40

VISSER J, MELCHELS FPW, JEON J E, BRUSSEL EMV, KIMPTON LS, HELEN MB, DHERT WJA, DALTON DP, HUTMACHER WD, MALDA J (2015). “ Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils.” *Nature Communications* ;6:1–10.

WANG G, MISHRA B, LAU K, LUSHNIKOVA T, GOLLA R, WANG X (2014). “ Human antimicrobial peptides and proteins.” *Pharmaceuticals* 7(5), 545–594.

WU T, HUANG J, JIANG Y, HU Y, YE X, LIU D, CHEN J (2018). Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity. *Food Chemistry*, 240, 361–369.

YANG MY, CHAN JG, CHAN HK (2014). Pulmonary drug delivery by powder aerosols. *Journal of the Control Release Society*, 193:228-240.

YANG YY, CHUNG TS, NGEE NP (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, 22:231-241

YIN J, NODA Y, YOTSUYANAGI T (2006). Properties of poly(lactic-co-glycolic acid) nanospheres containing protease inhibitors: camostat mesilate and nafamostat mesilate. *Int. J. Pharm.* 314: 46-55.

EK-1.

formed. In the second method, both homogenization using Ultraturrax and high pressure homogenization with different pressure were applied and the organic phase was evaporated (6 or 24 h) to form nanoparticles. Filtration through cellulose acetate filters (0.20 µm) was employed to some of the samples. Particle size and PDI values of EC-NP were measured using a Malvern Zetasizer ZS.

Results: As for EC-NP applied first preparation method, the particle size were between 199.3-248.4 nm while PDI values were below 0.2 depending on concentration of PVA used (Table 1).

Table 1. Particle size and PDI values of EC-NP obtained by first preparation method (n=3).

PVA (%)	Santrifuge (rpm)	Evaporation Time (h)	Mean Particle Size (nm)±SD	PDI±SD
0.2%	10.000	4	230.5±1.36	0.127±0.02
1%	10.000	4	248.4±12.88	0.180±0.04

For the EC-NP prepared by second method, the particle sizes of the formulations were between 154.8-179.8 nm and PDI values were less than 0.3 (Table 2) depending on the different process parameters used.

Table 2. Particle size and PDI values of EC-NP obtained by using different process parameters (n=3).

Pressure (bar)	Cycle	Evaporation time (h)	Filtration	Mean Particle Size (nm)±SD	PDI±SD
800	8	6	+	154.8±7.33	0.207±0.01
1200	8	24	-	177.8±8.38	0.248±0.01
1200	8	24	+	179.8±5.51	0.271±0.01

Conclusions: It was concluded that process parameters such as pressure, cycle, evaporation time, filtration and PVA amount have critical effects on the particle size distribution of EC-NP.

Acknowledgment

Beril Tas is supported by TUBITAK 2244 grant, covering the co-operation between Hacettepe University and Novagenix Bioanalytical Drug R&D Center.

References:

1. Ravikumara et al., (2009). J Biomater App, 47-64.
2. Lokhande et al. (2013). J Pharm Res, 421-426.

P005: A NOVEL RP-HPLC METHOD TO DETERMINE IRBESARTAN AND HYDROCHLOROTHIAZIDE IN FIXED DOSE COMBINATIONS: METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION

^{1,2}Kaval, B., ^{3,4}Özcan, S., ^{2,5}Kaynak, M.S.

¹ Mugla Sıtkı Kocman University, Koycegiz Vocational School of Health Services, Department of Pharmacy Services, Mugla, Turkey, bernakaval@mu.edu.tr

² Anadolu University, Department of Pharmaceutical Technology, Eskisehir, Turkey

³ Anadolu University, Department of Analytical Chemistry, Eskisehir, Turkey

⁴ Anadolu University, Doping and Narcotic Compounds Analysis Laboratory, Eskisehir, Turkey

⁵ Anadolu University, Yunus Emre Vocational School of Health Services, Department of Pharmacy Services, Eskisehir, Turkey

Introduction: Hypertension is an important public health problem because of its worldwide prevalence and its potential for death when combined with other diseases (1). The active pharmaceutical ingredients irbesartan (IRB) and hydrochlorothiazide (HCT) have been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of hypertension. In our study, we will perform quality control (QC) tests on combined all IRB/HCT tablets available in the Turkish market.

Materials and Methods: IRB/HCT (300/25 mg) fixed dose combination drug product from the Turkish pharmaceutical market were chosen for the studies. IRB and HCT were quantified using HPLC with photo-diode array detection at 230 nm in the presence of avanafil (AVA) as an internal standard. C₁₈ core-shell column (SUPELCO® Ascentis Express, 100 × 4.6 mm, 2.7 µm i.d.) was used for separation. 30 mM sodium acetate buffer: water: acetonitrile (40:40:20, v/v/v) was used as the mobile phase in gradient separation mode. The developed method was fully validated in accordance with the ICH Q2 (R1) guidelines (2).

Results: The retention times of HCT, IRB and AVA were 2.8, 4.6, and 5.3 min respectively. The regression coefficients of the calibration lines were found to be 0.9996 and 0.9980 for IRB and HCT. The recovery values of one of the randomly selected market preparations were 99.0% - 100.1% for IRB and 98.6%-100.9% for HCT. All tablet data has been evaluated and interpreted in accordance with USP standards.

Conclusions: The full validated method was successfully applied to studies of content uniformity and dissolution. It was discovered that the method we developed can be used to determine both IRB and HCT at the same time.

References:

1. Kearney et al., (2005). The Lancet, 365(9455): 217-223.
2. Guideline (2005). ICH Harmonised Tripartite. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 1.20 05.

P006: PREPARATION AND EVALUATION OF LYSOZYME LOADED POLYCAPROLACTONE MICROPARTICLES USING THE FULL FACTORIAL DESIGN

¹Devrim, B., ²Erdinc, N.

¹ Ankara University, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, Turkey, bdevrim@pharmacy.ankara.edu.tr

² Turkish Medicines and Medical Devices Agency, Ankara, Turkey, nilhanecz@gmail.com

Introduction: The growing problem of multidrug-resistant bacteria has encouraged the search for therapeutic alternatives to conventional antibiotics. To this end, there is a growing interest in the use of antimicrobial peptides (1). Lysozyme is a monomeric protein that can be used in the treatment of microbial infections due to its antimicrobial activity, but the relatively narrow antimicrobial spectrum, instability and easy inactivation make the practical application of free lysozyme quite limited (2). Considering these reasons, poly-ε-caprolactone (PCL) microparticles of lysozyme were prepared using the full factorial design in this study.

Materials and Methods: Lysozyme, egg white was obtained from Vivantis (Oceanside, CA). Poly-ε-caprolactone (PCL), poly(vinyl alcohol) (PVA) and dichloromethane (DCM) were from Sigma (Germany). Lysozyme loaded microparticles were prepared by w/o/w double emulsion solvent evaporation method. Based on a 2⁴ full factorial design, different lysozyme concentrations, DCM volumes, PVA volumes and stirring rates were used as independent variables. Particle size of microparticles were measured with a laser diffraction particle size analyzer (Mastersizer 3000, Malvern Panalytical, UK). The encapsulation efficiency (%) was calculated using following equation. Encapsulation efficiency (%)=(Calculated drug concentration)/(Theoretical drug concentration)×100.

Results: The effects of DCM volume, PVA volume and stirring rate on particle size were found to be significant (p<0.05). Otherwise, the effects of lysozyme concentration and PVA volume on encapsulation efficiency is significant (p<0.05).

Conclusions: The PCL microparticles containing lysozyme were prepared successfully by using w/o/w double emulsion solvent evaporation method. As a result, lysozyme loaded PCL microparticles can be used in the treatment of microbial infections.

References:

- 1.Tapan et al., (2011). Experimental Lung Research, 37:9, 536-541.
2. Wu et al., (2017). Carbohydrate Polymers, 155, 192–200

P007: EVALUATION OF IN VITRO-IN VIVO RELATIONSHIP: BOSENTAN-LOADED LIPID BASED FORMULATION VERSUS COMMERCIAL PRODUCT

^{1,2}Timur, B., ¹Yilmaz Usta, D., ¹Teksin, ZS.

¹ Gazi University, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, Turkey, yilmazduygustu@gazi.edu.tr

² Zonguldak Bülent Ecevit University, Department of Pharmaceutical Technology, Zonguldak, Turkey, burcu.timur2@gazi.edu.tr

Introduction: In the U.S. FDA guidance, In Vitro-In Vivo Relationship (IVIVR) is defined as a relationship between in vivo bioavailability and the in vitro release profiles, which can be described by a relationship other than that of a straight line (1). A stronger relation provides a prediction of in vivo results using in vitro data. Moreover, IVIVR allows a decrease in the number of in vivo studies, formulation optimization, enhance product quality, reduce costs of drug development (2). The aim of this study was to investigate IVIVR for Bosentan-loaded SNEDDS, S-SNEDDS tablet, and commercial product (Tracleer®).

Materials and Methods: Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomials (PCHIP) method was used to develop point-to-point relation between in vitro dissolution data and in vivo plasma concentration by MATLAB Version 9.10 (MathWorks, MA, USA). With this method, the unknown intermediate values (the missing points) were found at any unknown intermediate time points (3). With this method, the data set was generated by applying interpolation to 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 50, 55, and 60 minutes. The relationship between in vitro and in vivo data at these time points was evaluated.

Results: The relationship between fasted group plasma concentration and FaSSIF, FaSSIF V2, FDA-recommended media (a distilled water media containing 1% SLS), and the relationship between fed group plasma concentration and FeSSIF, FeSSIF V2, FDA-recommended media were evaluated. The correlation coefficient (R²) was given in Table 1.

Table 1. The correlation coefficient for reference, SNEDDS, and S-SNEDDS tablet in the fed and fasted states

Fasted state	Reference			SNEDDS			S-SNEDDS tablet		
	FaSSIF V2	FaSSIF	1% SLS	FaSSIF V2	FaSSIF	1% SLS	FaSSIF V2	FaSSIF	1% SLS
R ²	0.988	0.986	0.773	0.989	0.930	0.536	0.974	0.963	0.955
Fed state	FaSSIF V2	FaSSIF	1% SLS	FaSSIF V2	FaSSIF	1% SLS	FaSSIF V2	FaSSIF	1% SLS
R ²	0.540	0.463	0.442	0.965	0.937	0.540	0.940	0.906	0.914

The biorelevant media simulate gastrointestinal fluids better than FDA-recommended media. Compared to 1% SLS, the stronger relation was obtained in biorelevant media.

Conclusions: The positive relations were successfully obtained between in vitro dissolution data and in vivo plasma concentration. Since the SNEDDS and S-SNEDDS tablet increased solubility, dissolution, and lymphatic absorption of bosentan, a higher relation was observed between in vitro dissolution and plasma concentration. The lower correlation coefficient was obtained in the

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Ad, Soyad Nilhan ERDİNÇ

Doğum yeri ve tarihi

Uyruğu

Medeni durumu

İletişim adresi

II- Eğitimi

III- Mesleki Deneyimi

-