

İLYAS BACIROV

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2021

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

(YÜKSEK LİSANS)

**VANKOMİSİN'İN PULMONER YOLLA UYGULANMAK
ÜZERE MİKROPARTİKÜLER KURU
TOZ İNHALER FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ**

İLYAS BAGHIROV

**DANIŞMAN
PROF. DR. ERDAL CEVHER**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
TEŞEKKÜR.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İÇİNDEKİLER	İİ
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Vİİİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Solunum Sisteminin Yapısı.....	4
2.2. Pulmoner epitelin yapısı	5
2.3. Pulmoner Yolla İlaç Uygulama Yöntemleri	6
2.3.1. Nebulizatörler.....	6
2.3.2. Ölçülü Doz İnhalerler.....	7
2.3.3. Kuru Doz İnhalerler	8
2.4. Pulmoner Yolla İlaç Kullanmanın Avantaj ve Dezavantajları	9
2.5. Respiratuvar Bölgede Partikül Birikimi.....	10
2.6. Pulmoner İlaç Taşıyıcı Sistemler	12
2.6.1. Lipozomlar	12
2.6.2. Nanopartiküller	13
2.6.3. Mikropartiküller	13
2.7. Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	14
2.7.1. Kitosan	14
2.7.2. Hiyalüronik Asit.....	15
2.7.3. Polilaktik-ko-glikolik asit	15
2.8. Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri	16
2.8.1. Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi.....	17
2.9. Mikropartiküllerde Yapılan Kontroller.....	18

2.9.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyali.....	18
2.9.1.1. Zetasizer Nano ZS.....	18
2.9.2. Mikropartiküllerin Morfolojik Özellikleri	19
2.9.3. Çözünme Hızı	19
2.9.4. Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirilmesi	20
2.10. İn Vitro Performans Analizleri	20
2.10.1. DUSA Analizi	20
2.10.2. NGI analizi	21
2.11. Akciğer Enfeksiyonları	23
2.12. <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.13. İn hale Antibiyotikler	24
2.13.1. Vankomisin	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	28
Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	29
3.2. Etken Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	30
3.2.1. Etken Maddenin Ultra Viole (UV-Vis) Spektrofotometresi ile Analizi	30
3.2.2. Etken Maddenin Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması.....	30
3.2.3. Kalibrasyon Doğrularının Analitik Validasyonu	30
3.2.3.1. Doğrusallık.....	31
3.2.3.2. Doğruluk	31
3.2.3.3. Kesinlik	31
3.2.3.4. Seçicilik (Özgünlük)	32
3.2.3.5. Tehşis Limiti (LOD)	32
3.2.3.6. Miktar Tayini Limiti (LOQ).....	33
3.3. Mikropartiküllerin Hazırlanması	33
3.3.1. Önformülasyon Çalışmaları	34
3.3.1.1. Etken Madde Yükleme Çalışmaları	34
3.3.1.2. Farklı Polimerlerle Yapılan Önformülasyon Denemeleri	35
3.3.2. Formülasyon Çalışmaları	35
3.4. Mikropartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	36
3.4.1. Partikül Büyüklüğünün Saptanması.....	36

3.4.2. Mikropartiküllerin Yüzey Yüklerinin Tayini.....	36
3.4.3. Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi.....	37
3.4.4. Mikropartiküle Yüklenen Etken Maddenin Miktar Tayini.....	37
3.4.5. Etken Maddenin Enkapsülasyon Etkinliği Tayini	37
3.4.5.1. İn Direkt Metotla Enkapsülasyon Tayini	37
3.4.5.2. Direkt Metotla Enkapsülasyon Tayini	37
3.4.6. Ürün Verimi Tayini.....	38
3.4.7. İn Vitro Çözünme Hızı Deneyi	38
3.4.8. Dondurarak Kurutma ve Stabilizasyon Çalışması	38
3.4.9. İn Vitro Performans Testleri	39
3.4.9.1. NGI Analiz	39
3.4.9.2. DUSA analizi	40
4. BULGULAR.....	42
4.1. Vankomisin hidroklorürün Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ile İlgili Bulgular.....	42
4.1.1. Vankomisin hidroklorürün UV-vis Spektrofotometrisi ile Analizi Bulguları ..	42
4.1.2. Kalibrasyon Doğrularının Analitik Validasyonuna ait bulgular	42
4.1.2.1. Doğrusallık.....	42
4.1.2.2. Doğruluk	43
4.1.2.3. Kesinlik	44
4.1.2.4. Seçicilik (Özgünlük)	45
4.1.2.5. Teşhis sınırı (LOD)	46
4.1.2.6. Tayin sınırı (LOQ)	46
4.2. Önformülasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular	46
4.2.1. Etken Madde Yükleme Çalışmaları	46
4.2.2. Polimer Seçimine Ait Önformülasyon Çalışmaları	46
4.3. Formülasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular	47
4.3.1. Partikül Büyüklüğünün Saptanması ile İlgili Bulgular	47
4.3.2. Zeta potansiyel Ölçümlerine Ait Veriler.....	50
4.3.3. Mikropartikül Formülasyonlarının Enkapsülasyon Etkinliğine Dair Veriler ...	50
4.3.4. Ürün Verimliliğine Ait Bulgular.....	51
4.3.5. İn Vitro Çözünme Hızı Bulguları.....	52
4.3.6. Dondurarak Kurutma ve Stabilizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	53

4.3.7. İn Vitro Performans Testlerine Ait Bulgular	56
4.3.7.1. NGI Analizine Ait Bulgular	57
4.3.7.2. DUSA Analizine Ait Bulgular	59
4.3.8. Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular	59
5. TARTIŞMA	62
KAYNAKLAR	72
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ÖZGEÇMİŞ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Vankomisin HCl yüklemesi yapılan önformülasyon çalışmaları	35
Tablo 3-2: Farklı polimerler kullanılarak hazırlanan formülasyonlar	35
Tablo 3-3: Hazırlanan formülasyonlar.....	36
Tablo 3-4: Stabilizasyon çalışması için hazırlanan formülasyon örnekleri.....	39
Tablo 3-5: NGI analizinde kullanılan formülasyonlar.....	40
Tablo 3-6: DUSA analizinde kullanılan formülasyonlar	41
Tablo 4-1: Vankomisin hidroklorürün standart eğrisine ait parametreler	43
Tablo 4-2: Vankomisin hidroklorürün miktar tayini yönteminin doğrusallığına dair veriler	43
Tablo 4-3: Vankomisin hidroklorürün miktar tayini yönteminin doğruluk çalışması verileri (n=6).....	44
Tablo 4-4: Vankomisin hidroklorürün miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik ölçümlerine dair veriler (n=6).....	44
Tablo 4-5: Vankomisin hidroklorürün miktar tayini yönteminin ara kesinlik ölçümlerine dair veriler (n=6).....	45
Tablo 4-6: Farklı miktarlarda Vankomisin yükleyerek yapılan önformülasyon çalışmalarına ait veriler.....	46
Tablo 4-7: Farklı PLGA Rosomerleri kullanılarak yapılan önformülasyon çalışmaları	47
Tablo 4-8: Formülasyonlara ait partikül büyüklüğü ve PDI değerleri.....	47
Tablo 4-9: Zeta potansiyel ölçümlerine ait veriler.....	50
Tablo 4-10: Enkapsülasyon etkinliğine ait veriler.....	51
Tablo 4-11: Ürün Verimliliğine Ait Bulgular.....	52
Tablo 4-12: İn vitro çözünme hızı verileri.....	53
Tablo 4-13: Liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları.....	54
Tablo 4-14: Liyofilizasyon sonrası polidispersite indeksi ölçüm sonuçları	55
Tablo 4-15: Liyofilizasyon sonrası Zeta potansiyel ölçüm sonuçları.....	56
Tablo 4-16: NGI cihazının bölmelerinde biriken mikropartikül miktarı.....	57
Tablo 4-17: NGI analiz sonuçlarına göre yapılan mikropartiküllerin aerodinamik değerlendirilmesi	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Solunum sisteminin yapısı	4
Şekil 2-2: Pulmoner epitelin yapısı (Gkatzis ve ark., 2018).....	5
Şekil 2-3: Nebulizatör Hospyneb® (Saz ve ark., 2009)	6
Şekil 2-4: Ölçülü doz inhaler	7
Şekil 2-5: Bazı kuru toz inhalerler. (İslam ve ark., 2008)	8
Şekil 2-6: Partiküllerin respiratuvar bölgede tutulma mekanizmaları (Taylor 2002).....	10
Şekil 2-7: Malvern Zetasizer Nano ZS	18
Şekil 2-8: İn vitro çözünme hızı çalışmalarının kullanım şeması (Usta ve ark., 2015)..	19
Şekil 2-9: DUSA cihazı	21
Şekil 2-10: NGI cihazı	21
Şekil 2-11: NGI cihazının partikülleri ayırma bölümleri.....	22
Şekil 2-12: Vankomisin kimyasal yapı gösterimi (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi 2020).....	25
Şekil 3-1: Poröz mikropartiküllerin hazırlanma mekanizması	34
Şekil 4-1: Vankomisin hidroklorürün standart eğri grafiği	42
Şekil 4-2: Boş mikropartikül formülasyonunun UV-Vis Spektrofotometresi ile taranması.....	45
Şekil 4-3: NOP ve ABC-0 formülasyonuna ait Zetasizer görüntüleri	48
Şekil 4-4: ABC-5, ABC-7,5 ve ABC-10 formülasyonuna ait Zetasizer görüntüleri.....	48
Şekil 4-5: SC-5, SC-7,5 VE SC-10 formülasyonuna ait Zetasizer görüntüleri	49
Şekil 4-6: SBC-5, SBC7,5 ve SBC-10 formülasyonuna ait Zetasizer görüntüleri	49
Şekil 4-7: İn vitro salım çalışması yapılan formülasyonların çözünme hızı grafikleri...	53
Şekil 4-8: Analiz için kapsüllere doldurulmuş formülasyonlar	57
Şekil 4-9: SV-003 formülasyonunun NGI cihazının bölmelerinde birikmesi	58
Şekil 4-10: NGI analizinin sonuçlarının histogramları.....	58
Şekil 4-11: DUSA analizi sonuçları.....	59
Şekil 4-12: NOP formülasyonunun SEM görüntüsü.....	60
Şekil 4-13: ABC-5: formülasyonunun SEM görüntüsü.....	60
Şekil 4-14: ABC-7,5 formülasyonunun SEM görüntüsü.....	61
Şekil 4-15: SC-5 formülasyonunun SEM görüntüsü	61

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

%E: Enkapsülasyon oranı

ABC: Ammonium bikarbonat

ABS_{ORT}: Absorbans ortalamaları

BPB: NGI cihazının bölmelerinde biriken minimum partikül boyutu

CED: Teslim edilen doz

CFU: Koloni oluşturan birim

C_{ort}: Ortalama konsantrasyon

CS: Kitosan

C_{sup}: Süpernatandaki etkin madde miktarı

C_{teorik}: Teorik etkin madde miktarı

C_y: Yüklenen etkin madde miktarı

Ç_o: Çarpma oranı

D: Difüzyon katsayısıdır

d: Partikül çapı

DCM: Diklorometan

DUSA: Dozaj Birimi Numune Alma Aparatı

FDA: Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi

FPM: İnce parçacık kütlesi

g: Yerçekimi sabiti

GCS: Glikol kitosanın

GMP: İyi Üretim Uygulamaları

h: Viskozite

HA: Hyaluronik asit

HPLC: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi

HPMC: Hidroksipropil-Metilselüloz

i.v.: Intravenöz

K/Y/S: Su içinde yağ içinde katı

k_B : Boltzmann'ın sabitidir

KF: Kistik fibrozis

KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

KTİ: Kuru toz inhalerler

LOD: Teşhis Limiti xvii

LOQ: Tayin Limiti

LPP: Büyük gözenekli mikropartiküller

MIC: Minimum inhibitör konsantrasyonu

MMAD: Kütle medyan aerodinamik çapıdır

MOC: Mikro-delik toplayıcı

MP: Mikropartikül

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*

NGI: Next Generation Impactor

ÖDİ: Ölçülü doz inhalerler

PBS: Fosfat tamponlu salin

PCL: Polikaprolakton

PDI: Polidispersite indeksi

PLGA: Poli(laktik-ko-glikolik asit)

POA: Porözite Oluşturucu Ajan

PVA: Poli vinil alkol

r: Hava yolunun yarıçapı

r: Korelasyon katsayısı

r^2 : Determinasyon katsayısı

rpm: Dakikadaki devir sayısı

RSD: Bağlı Standart Sapma

S/Y/S: Su içinde yağ içinde su

s: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

SBC: Sodyumbikarbonat

SC: Sodyumkarbonat

SD: Standart sapma

SEM: Taramalı Elektron Mikroskopu

PB: Partikül büyüklüğü

T: Mutlak sıcaklıktır

TGA: Tioglikolik asit

UV: ultraviyole

UV-Vis: Ultraviyole ve görünen ışık

V: Hava akımı hızı

VANKO: Vankomisin hidroklorür

V_t : Sedimentasyon hızı

V_t : Terminal çökme hızı

Y/S: Yağ içinde su

Y/Y/S: Su içinde yağ içinde yağ

Y/Y: Yağ içinde yağ

y: kesişim değerlerinin standart sapması

y: Kesişim değerlerinin standart sapması

ZP: Zeta potansiyeli

η : Hava viskozitesi

θ : Hava yollarının yönündeki değişiklik

λ_{max} : Maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları

ρ : Partikül yoğunluğu



ÖZET

Baghirov, İ.O. (2021). Vankomisin'in pulmoner yolla uygulanmak üzere mikropartiküler kuru toz inhaler formülasyonlarının geliştirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmanın amacı, akciğerlere lokal uygulamak için uygun aerodinamik özelliklere, yüksek ilaç kapsülleme verimliliğine sahip ve 24 saat boyunca salım yapabilen vankomisin hidroklorür mikropartiküllerin hazırlanması ve *in vitro* performans testlerinin yardımıyla ilacın akciğerlerdeki dağılımının incelenmesidir.

Özellikle akciğer enfeksiyonlarında istenen bölgede gerekli olan minimum inhibisyon konsantrasyonuna ulaşmak için sistemik olarak yüksek miktarda antibiyotik verilmesi gerekmektedir. Bu da kendisiyle birlikte sistemik yan etkileri getirmektedir. Akciğerlerin, geniş yüzey alanı, ince epitel tabakası, yüksek damarlanma ağı ve ilk geçiş etkisini elimine edilebilmesi gibi avantajlara sahip olduğunu göz önüne alarak vankomisin hidroklorürün mikropartiküler kuru toz formülasyonunun hazırlanması hedeflenmiştir.

Mikropartiküler kuru toz formülasyonları S/Y/S emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniğiyle hazırlanmıştır. Formülasyonların hazırlanmasında biyouyumlu ve bozunabilir olduğu FDA tarafından onaylanan PLGA (poli(laktik-ko-glikolik) asit) kullanılmıştır. Formülasyonlara salımı kontrol etmek ve aerodinamik özelliklerini iyileştirmek için porözite oluşturuca ajanlar eklenmiştir. Daha sonra eklenen porojenlerin mikropartikül formülasyonlarında partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinlikleri, ürün verimi ve *in vitro* salım çalışmaları incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre Amonyum bikarbonatın 7,5 mg kullanıldığı formülasyonu uygun bulunmuş ve *in vitro* performans testlerine bu formülasyon ile devam edilmiştir. Seçilen formülasyonun piyasada hazır halde bulunan laktozlarla (InhaLac® 230, Lactohale® 200, Respitose® ml003, Respitose® sv003) karıştırılarak NGI ve DUSA testleri yardımıyla mikropartiküllerin aerodinamik özellikleri incelenmiştir. Kullanılan yardımcı maddelerin, mikropartikül formülasyonlarının aerodinamik özelliklerini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Tez çalışmamızda edilen sonuçlar, vankomisin hidroklorür'ün mikropartiküler kuru toz formülasyonunun uygun özelliklerde hazırlandığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Vankomisin, kuru toz inhaler, mikropartikül, NGI, DUSA

ABSTRACT

Baghirov, İ.O. (2021). Development of microparticulate dry powder inhaler formulations of vancomycin for pulmonary delivery. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology. Master thesis. İstanbul.

The aim of this study was to prepare vancomycin hydrochloride microparticles that have aerodynamic properties, high drug encapsulation efficiency and can release for 24 hours for local administration to the lungs and investigate the distribution of the drug in the lungs with the help of *in vitro* performance tests.

Especially in lung infections, systemically high amounts of antibiotics should be administered to achieve the required minimum inhibition concentration in the essential area. This brings systemic side effects with it. Considering that the lungs have advantages such as large surface area, thin epithelial layer, high vascularity network and elimination of first pass effect and it is aimed to prepare a microparticulate dry powder formulation of vancomycin hydrochloride.

Microparticulate dry powder formulations were prepared by the W/O/W emulsion solvent evaporation technique. In the preparation of the formulations, PLGA (poly (lactic-co-glycolic) acid), which has been approved by the FDA to be biocompatible and degradable was used. Porosity forming agents have been added to the formulations to control release and improve aerodynamics. After that particle size and particle size distribution, zeta potential, encapsulation efficiency, product yield and *in vitro* release studies were investigated in microparticle formulations of the added porogen. Based on from results the ABC-7,5 formulation was found suitable and *in vitro* performance tests were continued with this formulation. The aerodynamic properties of the microparticles were investigated by mixing the selected formulation with the lactose available in the market (InhaLac® 230, Lactohale® 200, Respitose® ml003, Respitose® sv003) with the help of NGI and DUSA tests. The excipients used have been found to improve the aerodynamic properties of the microparticle formulations. The results of our thesis concluded that the microparticulate dry powder formulation of vancomycin hydrochloride was prepared with appropriate properties.

Key Words: vancomycin, dry powder inhalers, microparticles, NGI, DUSA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer enfeksiyonlarına bağlı hastalıklar, oldukça yaygın ve tüm yaş gruplarını etkileyen önemli bir sağlık problemidir. Günümüzde bu hastalıkların tedavisi, genellikle antibiyotiklerin oral ve parenteral uygulanması yoluyla yapılmaktadır. Ancak antibiyotiklerin yüksek dozda sistemik uygulanması çeşitli yan etkilere neden olduğu bilinmektedir. Garonzik ve arkadaşlarının 2011 yılında kolistin kullanarak yaptığı bir çalışmada akciğerdeki enfekte olmuş bölgeyi tedavi etmek için kullanılan sistemik dozun hastaların %60'ında nörotoksisite ve nefrotoksisiteye yarata bileceği belirtilmiştir (Garonzik ve ark., 2011). Bu nedenler göz önüne alındığında akciğeri direkt hedef alan ve böylece sistemik etkiyi minimum düzeye çekebilecek bir tedavi yöntemine ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Akciğerlerin, geniş yüzey alanı, ince epitel tabakası, yüksek damarlanma ağı ve ilk geçiş etkisini elimine edilebilmesi gibi hem lokal hem sistemik tedaviler açısından avantajlara sahip olduğu bilinmektedir. Akciğerler aynı zamanda astım, kistik fibrozis, akciğer kanseri, tüberküloz gibi hastalıklarda, sistemik tedavideki istenmeyen etkiler olmaksızın, hastalıklı bölgeye direkt ulaşımı sağlamaktadır (Labiris ve ark., 2006).

Vankomisin, yaklaşık 50 yıl önce penisilinaz üreten *Staphylococcus aureus* suşlarını tedavi etmek için alternatif bir penisilin olarak geliştirilmiş, orijinal olarak *Streptococcus orientalis* organizmasından türetilen bir trisiklik glikopeptid antibiyotiktir. Vankomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) dahil olmak üzere gram pozitif bakterilerin neden olduğu çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesi için kullanılır (Rybak ve ark., 2009). Günümüzde vankomisin sadece oral ve intravenöz formülasyonlarda mevcuttur; Oral vankomisinin aşırı zayıf biyoyararlanımı nedeniyle pnömoni hastalarının tedavisinde kullanılmamaktadır (Rodvold ve ark., 2014). Ne yazık ki, vankomisin böbrek toksisitesi ve ototoksisite ile ilişkilidir. İntravenöz Vankomisin uygulaması böbrek toksisitesi için potansiyel bir risk oluşturur, vankomisin kullanımı genellikle hastane ortamlarıyla sınırlıdır (Carreno ve ark., 2014).

Mikropartiküller, büyüklükleri 0.1 µm-200 µm arasında değişen küçük katı partiküller veya etrafı çeşitli sentetik veya doğal polimerlerle çevrili damlacıklardır

(Komatsu ve ark., 1983). Son yıllarda ilaç taşıyıcı olarak sıkça kullanılan mikropartiküller, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu biyomateryallerden hazırlanabilmektedir. Mikropartiküller, tedavide hedef bölgelere etkin madde taşıyabilme, etkin maddeyi enzimatik parçalanmadan koruma, uzun süreli salım sağlayabilme, suda çözünmeyen/az çözünen maddelerin taşınabilmesi ve biyoyararlanımının artırılması gibi avantajlar sağlamaktadır.

Kuru toz mikropartiküller kullanılarak inhale edilen antibiyotik tedavisi, hastalıklı hava yoluna ilaç dağıtımının çekici bir yoludur. Nebulizasyon ile karşılaştırıldığında, kuru toz inhalasyonu daha hızlıdır, minimum ekipman gerektirir ve ilacı ortam havasına dağıtma olasılığı daha düşüktür. Solunan kapsüllenmiş ilaçlar, sistemik olarak uygulanan muadilleriyle ilişkili toksisitelerin çoğunu önleyebilir. Bu faktörlerin uyumu, genel mikrobiyolojik başarıyı ve hasta sonuçlarını iyileştirmesi muhtemeldir (Tsifansky ve ark., 2008).

Şimdiye kadar, büyük gözenekli mikropartiküller (LPP), şişebilen mikropartiküller ve nanopartikül agregatları dahil olmak üzere partikül mühendisliği yoluyla pulmoner kontrollü salım iletim sistemlerinin geliştirilmesi için çok çaba sarf edilmiştir (El-Sherbiny ve ark., 2010). Bunlar arasında büyük gözenekli mikropartiküller gelecek adına en umut verici olanıdır. Büyük geometrik çap ve düşük kütle yoğunluğu ile karakterize edilen LPP'ler, alveolar fagositozu ve partikül agregasyon eğilimini azaltmış ve daha yüksek aerosolizasyon verimliliğine yol açmıştır (Hadinoto ve ark., 2007).

Biyouyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir poli (laktit-ko-glikolit) aside (PLGA) dayanan LPP'lerin, pulmoner ilaç iletimi için potansiyel sürekli salımlı taşıyıcılar olarak önerilmiştir. Tek emülsiyon çözücü (Y/S) yöntemi ile hazırlanan PLGA mikropartiküllerinin, çift emülsiyon (S/Y/S) yöntemi ile yapılanlara kıyasla doğal olarak daha az gözenekli olduğu bildirildiğinden, LPP'ler esas olarak çift emülsiyon yoluyla üretilmiştir. Sodyum klorür (Péan ve ark., 1998), albüminler (Lee ve ark., 2010), siklodekstrin türevleri (Ungaro ve ark., 2006), amonyum bikarbonat (Oh ve ark., 2011), kanola veya silikon yağı gibi yağlar (Arnold ve ark., 2007), da dahil olmak üzere mikropartiküllere arzu edilen gözenekliliği dahil etmek için farklı gözenek oluşturuju ajanlar (porojenler) kullanılmıştır. Porojen kalıntısı ile ilgili güvenlik sorunu,

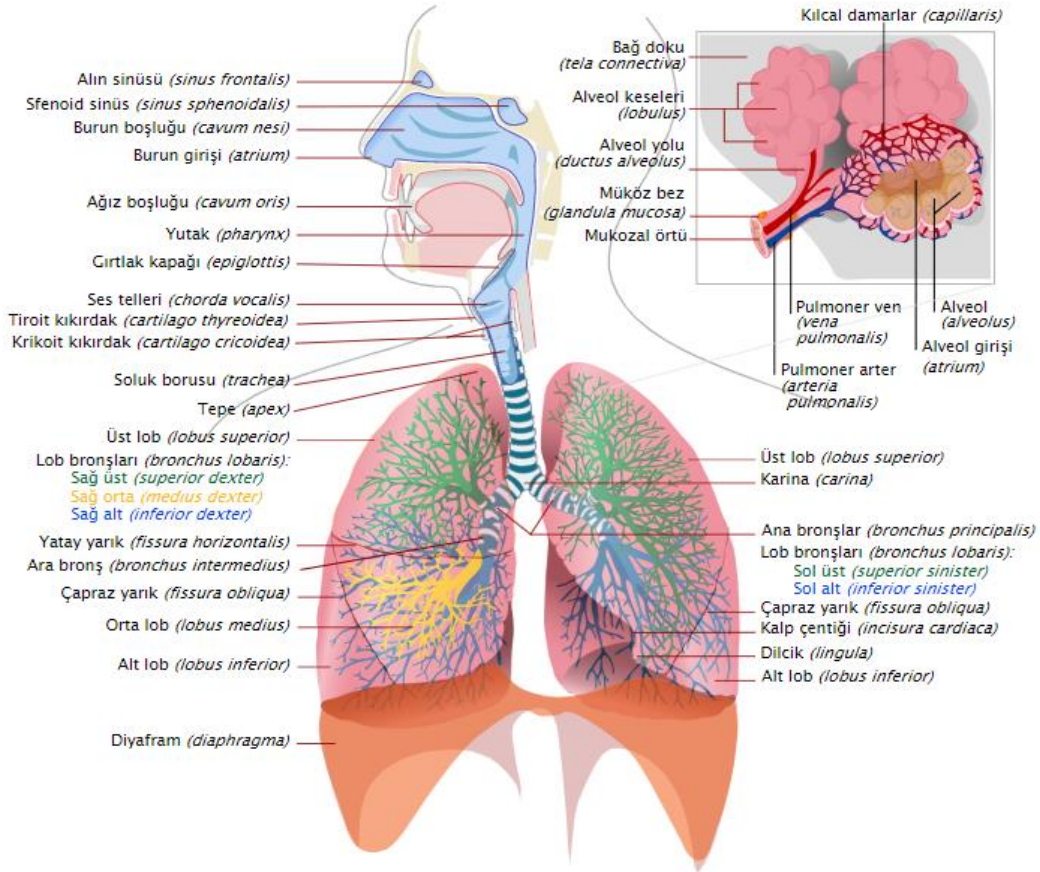
düşük ilaç yüklemesi ve karmaşık işleme, yukarıda bahsedilen porojenler için ana eksikliklerdir.

Bu çalışmanın amacı, uygun aerodinamik özelliklere, yüksek ilaç kapsülleme verimliliğine ve gözenek ayarlaması yoluyla ilaç salım hızının ayarlanmasında esnekliğe sahip gözenekli mikropartiküllerin hazırlanması için basit ve etkili bir yöntemin geliştirilmesidir. Çalışmamızda çift emülsiyon (S/Y/S) yöntemiyle PLGA bazlı mikropartiküllerin hazırlanması hedeflenmiştir. Mikropartiküllerin gözenekli yapıda olabilmesi için amonyum bikarbonat (ABC), sodyum bikarbonat (SBC) ve sodyum karbonat (SC) tuzları kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar üzerinde partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI), yüzey gerilimi, enkapsülasyon etkinliği gibi analizler yapılmıştır. Daha sonra formülasyonların optimizasyonu takiben, NGI ve DUSA analizleri ile *in vitro* performans etkinliği incelenmiş ve mikrobiyolojik testler ile antibakteriyel araştırılmasına ait çalışmalar tamamlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Solunum Sisteminin Yapısı

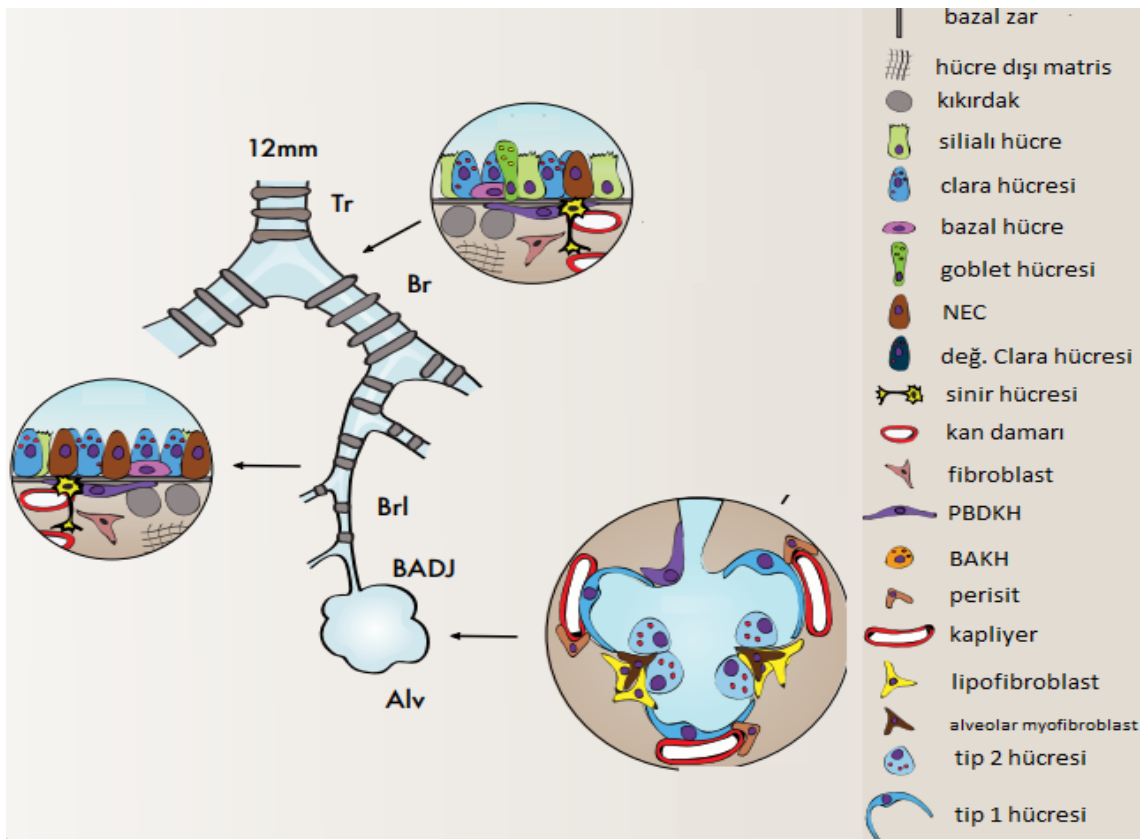
Akciğerdeki ilaç dağılımı, akciğerin anatomisi ile direkt bağlantılıdır. Pulmoner sistemi incelemek için, üst bölge ve alt bölge olacak şekilde iki kısma ayırabiliriz. Üst bölgeye ağız, nazal bölge, farenks, larenks, trake ve bronşları, alt bölgeye bronşioler ve alveolleri dahil ediyoruz. Üst bölgenin dallanmalarının görevi havayı nemlendirme, ısıtma ve alt bölgeye (respiratuvar bölge) ötürmekten ibarettir. Respiratuvar bölge adlandırdığımız alt bölgedeki dallanmalar ise gaz değişimi yapmakla sorumludur. Dallanma sayısı arttıkça gaz değişimi yapılan yüzey alanı da genişlemektedir (Stocks ve ark. 2002).



Şekil 2-1: Solunum sisteminin yapısı (https://tr.wikipedia.org/wiki/Solunum_sistemi)

2.2. Pulmoner epitelin yapısı

Pulmoner sistem 40'tan fazla farklı hücre tipine sahiptir. Bronşlardaki hücreler çoğunlukla goblet hücreleri ve silialı hücrelerden oluşmuş olup aralarında salgı hücreleri bulunmaktadır. Her bir silialı epitel hücrelerinin yaklaşık olarak 5 µm uzunluğa ve 0.25 µm çapa sahip ortalama 200 siliadan oluşmaktadır. Bronşiol bölgesindeki epitel silialı kübik hücrelerle baskın olup, ayrıca düz kas hücrelerini de bulundurmaktadır. Alt solunum yollarına gittikçe mukus salgılayan granüller içeren goblet hücreleri ve salgı hücreleri yavaş yavaş azalır, bronş salgısı ve metabolik aktivitesi yüksek Clara hücreleriyle artar. Alveolar bölgede epitel düz bir yüzeye sahip olmakla, 0.1-0.5 µm kalınlığındadır. Bu bölümde iki tip epitel hücresi vardır. Tip-1 pnömositler, ince yapıları hücreler olmakla beraber, bu hücrelerde hava-kan bariyeri oldukça yakındır. Alveol keseleri örten epitel neredeyse tamamen Tip-1 hücrelerden oluşturmakta, buna ek olarak az miktarda Tip-2 hücreleri de vardır. Tip-2 pnömositlerin akciğerde birkaç kritik rolü vardır. Bunlardan en önemlisi Pulmoner sürfaktanın salgılanmasıdır (Jacob ve ark. 2017). Geniş yüzey alanına sahip olan alveoller, aynı zamanda sık damarlanma açısından dolayı sistemik dolaşıma hızlı bir erişim sağlayabilmektedir.



Şekil 2-2: Pulmoner epitelin yapısı (Gkatzis ve ark., 2018)

2.3. Pulmoner Yolla İlaç Uygulama Yöntemleri

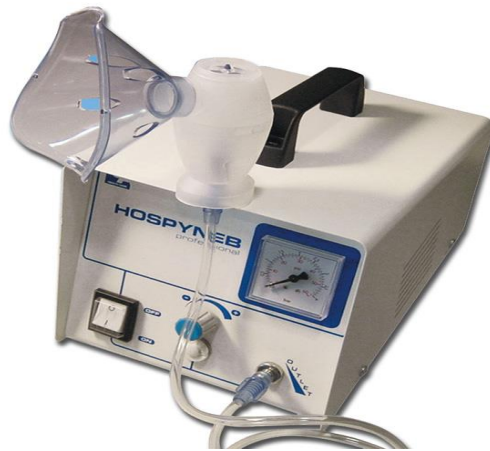
Mikropartiküllerin akciğerin alt bölgelerine ulaşabilmesi için kullanılacak olan inhalasyon cihazının, 2-7 μm büyüklüğünde mikropartiküller içeren ilaç formülasyonu dışarı verebilmesi önemlidir. Cihaz ayrıca verilen dozların tekrarlanabilirliğini ve saklama süresince formülasyonun fizikokimyasal stabilitesini de temin etmelidir. Şu anda İnhalasyon ilaç tedavisinde kullanılmak üzere üç ana tip inhalasyon cihazı bulunmaktadır:

- Nebulizatörler
- Ölçülü doz inhaleler (ÖDİ)
- Kuru toz inhaleler (KTİ)

2.3.1. Nebulizatörler

Nebulizatörler, sıvı ilacı, bir yüz maskesi veya ağız parçası aracılığıyla solunum yolunun alt kısmına doğrudan ulaşacak şekilde kolayca solunabilen aerosollere veya minimal boyutta ince buhara dönüştüren tıbbi cihazlardır. Bir nebulizatör, ilaçları alveollara kadar ulaşmak için solunabilecek şekilde buharlaştıran bir elektrikli kompresörle birlikte kullanılır. Aşağıdaki faktörler, ilacın hastada birikmesini etkiler:

- Kullanılan nebulizatör
- Hasta ve nebulizatör uyumu
- Hastanın nefes alma hızı (Lin ve ark., 2012)



Şekil 2-3: Nebulizatör Hospyneb® (Saz ve ark., 2009)

Nebulizatörler genellikle 4 yaş altı çocuklarda olmakla daha çok hastane ortamında, yatalak hastalarda veya diğer inhalasyon cihazlarını kullanmakta güçlük çeken hastalarda kullanılmaktadır. ÖDİ ve KTİ'lerle verilemeyecek kadar büyük dozlar da Nebulizatörler yardımıyla verilebilmektedir. Nebulizatörlerin diğer bir üstünlüğüse hiçbir nefes koordinasyonu gerektirmemesi ve sürekli inhalasyon sağlayabilmesidir. Bu cihazların Jet nebulizatör ve Ultrasonik Nebulizatör gibi farklı tiplerde ve farklı yöntemlerle damlacık oluşturabilen çeşitleri vardır. Jet Nebulizatörler, basınçlı bir gaz yardımıyla çözeltiyi kapiller içerisinden geçirerek, Ultrasonik nebulizatörler ise yüksek frekansta ses dalgalarının yarattığı vibrasyon yoluyla çözeltiyi veya süspansiyonu nebulize etmektedir. ÖDİ ve KTİ'lerle kıyaslandığında Nebulizatörler büyük boyut ve yüksek maliyet ve kullanımının zaman gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir.

2.3.2. Ölçülü Doz İnhalerler

Ölçülü doz inhalerleri (ÖDİ) 1950'lerin ortalarında piyasaya sürüldü ve en yaygın kullanılan inhalasyon ilaç verme cihazlarıdır. ÖDİ'lerde ilaç, yüzey aktif maddeler dahil olmak üzere diğer yardımcı maddelerle birlikte sıvı itici gaz (lar) içinde çözündürülür veya süspansiyon edilir ve bir ölçüm valfi bulunan basınçlı bir kutuda sunulur (Şekil 2-4). Ölçüm valfinin çalıştırılması üzerine bir sprej olarak önceden belirlenmiş bir doz salınır. Kutudan salındığında, formülasyon valf içindeki geçişte hacim genişlemesine uğrar ve açıklıktan boşaltılmadan önce bir gaz ve sıvı karışımı oluşturur. Yüksek hızlı gaz akışı, sıvının ince bir damlacık spreji halinde parçalanmasına yardımcı olur. Kolay kullanımı ve taşınabilirliği sayesinde özellikle astım ve KOAH hastalarında en çok kullanılan cihazdır (Çelik ve ark., 2010).



Şekil 2-4: Ölçülü doz inhaler

2.3.3. Kuru Doz İnhalerler

İyi tasarlanmış kuru toz inhalerler, pulmoner ilaç iletimi için oldukça verimli sistemlerdir. KTİ'ler günümüzde daha fazla etken madde taşıması, daha kolay stabilite sağlayabilmesiyle ÖDİ ve nebulizörlere alternatif olup çevreye zararlı gaz çıkarmamaları ve kompakt yapılarıyla öne çıkmaktadır. İlaç formülasyonunun kuru toz olması nedeniyle saklama süresince yüksek fizikokimyasal stabilite gösterebilmektedir. Özellikle kullanımındaki kolaylıklar (hastaların el-nefes koordinasyonuna gerek duymaksızın pasif nefesle dahi aktive ola bilmesi) KTİ'lerin yaşlı hastalarda geniş kullanımına olanak sağlamaktadır. Şekil 2-5' da KTİ'lerin farklı tipleri gösterilmiştir



Şekil 2-5: Bazı kuru toz inhalerler. (İslam ve ark., 2008)

(A) Aerolizer™, (B) Easyhaler™, (C) Turbohaler™, (D) Diskhaler™, (E) Novolizer™, (F) Rotahaler™, (G) Clickhaler™, (H) MAGhaler™, (I) Spinhaler™, (J) Handihaler™

KTİ'lar ucuz, kolay taşınabilir ve tekrar kullanılmaya olanak sağlayan cihazlar olmasının yanı sıra karmaşık sistemlerdir ki, performanslarına birçok neden etki etmektedir. KTİ'ları tasarlarırken ve değerlendirdirirken dikkate alınması gereken en önemli teknik hususlar şunlardır:

- aerosol oluşturmak için uygulanan toz dağılma prensibine özel vurgu yapan inhalatör tasarımı ve doz içeren aerosolün salındığı an
- inhalatörde kullanılan kuru toz formülasyonu
- hastanın nefes alma kuvveti ve süresi (Frijlink ve ark., 2004)

2.4. Pulmoner Yolla İlaç Kullanmanın Avantaj ve Dezavantajları

Pulmoner yolla ilaç kullanmanın özellikle akciğer hastalıklarında çok önemli avantajları bulunmaktadır:

- yukarıda bahsettiğimiz akciğerlerin yapısal avantajları
- sistemik tedavinin neden olacağı yan etki riskini minimum düzeyde tutması
- ilk geçiş eliminasyonunu elimine edebilmesi
- non-invaziv uygulama sağlamasıyla hasta uyuncunu arttırabilmektedir
- İnhalasyon cihazlarının geniş çeşitliliği

Bu uygulama yolu avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajlara da sahiptir:

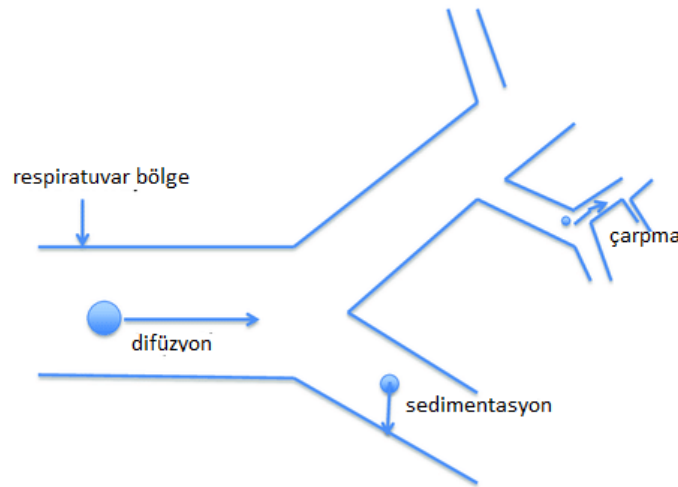
- çocuk ve yaşlı hastalarda uyuncu azaltabilmektedir.
- İlaç dozunun akciğerdeki dağılımı, hastanın kullanımından ve nefes alma şeklinden etkilenebilmektedir.
- Lokal etkili ilaçlarda oro-farenks bölgesinde fazla birikme, yan etkiler ortaya çıkarabilmektedir (Pham ve ark., 2015).

2.5. Respiratuvar Bölgede Partikül Birikimi

Pulmoner yolla verilen bir ilacın etkinliği, solunum sistemine nüfuz etme ve birikme kabiliyetine bağlıdır. Solunum bölgelerine nüfuz etmek ve alveollerde birikmek için ilaçların 1-6 μm aralığında olması tercih edilir. Daha büyük çaptaki partiküller gerekli bölgelere ulaşmamasının yanı sıra 1 μm 'den küçük olanlar nefesle birlikte dışarıya atıla bilmektedir. Partikül boyutlarına ek olarak hastanın nefes alma şekli, solunum yolunun morfolojisi ve inhalasyon cihazının ilaç salması da respiratuvar bölgede partikül biriktirmeye etki edebilmektedir.

Akciğerdeki partikül birikiminden başlıca üç mekanizmada bahsedebiliriz:

- ✓ Çarpma
- ✓ Sedimentasyon
- ✓ Difüzyon



Şekil 2-6: Partiküllerin respiratuvar bölgede tutulma mekanizmaları (Taylor 2002)

Çarpma: İn hale edilen ilaç partikülleri solunum yolları boyunca ilerlerken solunum yolunda çatallanmalar meydana geldiğinde yön değiştirir. Yeterince yüksek momentuma sahip olan hava akımı içindeki partiküller, değişen hava akımını takip etmek yerine hava yollarının duvarlarına çarparak etkilenirler. Bu biriktirme mekanizması, çapı 5 μm 'den büyük parçacıklar için özellikle önemlidir ve üst solunum yollarında yaygındır. İletken hava yollarının sürekli dallanmasıyla, hava akımının hızı azalır ve çarpma, birikme için daha az önemli bir mekanizma haline gelir.

$$C_o = V_t V \sin \theta / gr \quad (2-1)$$

C_o : çarpma oranı

θ : hava yollarının yönündeki değişiklik

r : hava yolunun yarıçapı

V : hava akımı hızı

V_t : terminal çökelme hızı

Sedimentasyon: Stoke yasasına göre, yerçekimi altında çöken bir parçacık, sabit bir son sedimentasyon hızına ulaşacaktır.

$$V_t = gd^2\rho / 18\eta \quad (2-2)$$

V_t : sedimentasyon hızı

ρ : partikül yoğunluğu

g : yerçekimi sabiti

d : partikül çapı

η : hava viskozitesi

Bu nedenle, solunan bir partikülün sedimentasyonu, hava yollarında kalma süresine ek olarak, partikülün boyutuna ve yoğunluğuna bağlıdır. Sedimentasyon, küçük hava yollarında ve alveollerde 1-5 μm boyut aralığındaki partiküller için önemli bir biriktirme mekanizmasıdır (Zeng ve ark., 2000).

Difüzyon: Küçük parçacıkların solunum yolundaki moleküller tarafından çarpışması ve bombardımanı Brownian hareketi üretir. Parçacıkların yüksek konsantrasyonlardan düşük konsantrasyonlara sonuçta ortaya çıkan hareketi, bunların aerosol bulutundan hava yollarının duvarlarına doğru hareket etmesine neden olur (Zeng ve ark., 2000).

Stokes – Einstein denklemi tarafından verilen difüzyon hızı partikül boyutu ile ters orantılıdır. Bu mekanizma 1 μm 'den küçük parçacıklar için baskın mekanizmadır:

$$D = k_B T / d 3\pi\eta \quad (2-3)$$

D : difüzyon katsayısıdır

k_B : Boltzmann'ın sabitidir

T : mutlak sıcaklıktır

h : viskozitedir

d : partikül çapıdır

İlacın pulmoner sistemde istenen bölgeye ulaşması için ilaç-cihaz kombinasyonu ve partiküllerin büyüklüğü oldukça önemlidir. Ekstradan, hastanın nefes alma hızı ve havanın akciğerlerde kalma süreside de partikül tutulumunu etkilemektedir. Hızlı yapılan bir inhalasyonla partiküller burun ve larinks yüzeyine çarpdığından akciğere ilerleyemesi zorlaşmaktadır. Yavaş yapılan bir inhalasyon ise 7 µm'ye kadar olan partiküllerin akciğere girmesini sağlamaktadır. İlâveten, hastalığa bağlı olarak akciğerlerde oluşan bronkokonstrüksiyon ve inflamasyon gibi haller, partiküllerin solunum yollarında birikeceği bölgeyi değiştirebilmektedir (Dolovich ve ark., 2019).

2.6. Pulmoner İlaç Taşıyıcı Sistemler

Pulmoner ilaç dağıtım sistemleri, farklı ilaçların uygulanması için ilaç taşıyıcıları olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Nanopartiküller, lipozomlar ve mikropartiküller gibi sistemler, çeşitli akciğer hastalıklarının tedavisi için uzun süredir araştırılmaktadır (Paranjpe ve ark., 2014).

2.6.1. Lipozomlar

Lipozomlar, güvenli yapılarıyla akciğerde kontrollü ilaç salınımı sağlayan, 20 nm- 10 µm arasında büyüklüğe sahip ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Lipozomlar vasıtasıyla pulmoner ilaç iletimi, akciğerlerde ilaç tutulma süresini artırabilir ve daha da önemlisi, pulmoner bölgede yan etkilerde bir azalmaya yol açar, bu da terapötik etkinliklerin artmasına neden olur. Yapılarında su fazdan oluşan çekirdeği saran en az bir lipit çift-tabaka bulunmaktadır. Bu lipit tabakalar aralarında sulu faz içermektedirler. Lipozomlar, yapılarındaki sulu faz nedeniyle hidrofilik ilaç moleküllerin, lipit çift-tabakalar sayesinde hidrofobik ilaç moleküllerin taşınabilmesine olanak vermektedirler (Huang ve ark., 2006).

Lipozomlar, tıbbi nebulizörler kullanılarak periferik hava yollarına büyük hacimlerde iletilmek üzere çok çeşitli terapötik molekülleri taşıyabilir. ÖDİ ve KTİ'ler basit lipozom hazırlama tekniklerini kullanarak büyük hacimler sağlayabilen tıbbi nebulizörlerle karşılaştırıldığında akciğere nispeten daha az miktarlarda ilaç taşıyabilmektedir. Bir dizi nebulize edilebilir lipozom formülasyonu klinik deneylere ulaşmıştır. Örneğin, Arikace® (lipozomal amikasin) ve Pulmaquin® (lipozomal

siprofloksasin) şu anda gelişimin ileri aşamalarında olan antibakteriyel formülasyonlardır (Elhissi, 2017).

2.6.2. Nanopartiküller

Nanopartiküller, 10-1000 nm boyutlarında, koloidal polimerik partiküllerdir. Etkin maddeler nanopartiküllere absorpsiyon, adsorpsiyon, birleşme veya kimyasal bağlama yoluyla yüklenerek taşınmaktadırlar. Diğer koloidal ilaç sistemleriyle karşılaştırıldığında Nanopartiküller sistemler vücut sıvılarında daha stabildirler (Paranjpe ve ark., 2014). Nanopartiküller aracılığıyla birçok hastalık için ilaçlar taşınabilmektedir. Kullanılan etken maddenin özelliklerine bağlı olarak, nanopartiküllerin yüzeyinde ve boyutunda değişiklikler yapılarak nanopartiküllerin dolaşım sisteminde kalış süresi ayarlanabilmektedir. Bunun sayesinde hazırlanan ilaç formülasyonu klirensten korunup, fiziksel bariyerlerin üzerinden taşına bilmekte ya da gerekli bölgede kalış süresi ayarlana bilmektedir. Bu sayede terapötik doza daha az ilaç konsantrasyonu ile ulaşıp, neden olunacak yan etkiler azaltılabilmektedir (Jawahar ve ark., 2012).

2.6.3. Mikropartiküller

Mikropartiküller, etrafı çeşitli sentetik veya doğal polimerlerle çevrili, 1-200µm boyutlarına sahip katı partiküllerdir. Arzu edilen tedavi şekline bağlı olarak farklı tiplerde mikropartiküller sistemler hazırlanabilmektedir. Pulmoner yolla ilaç teslimi için, büyük gözenekli mikropartiküller, şişebilen mikropartiküller ve katı lipit mikropartiküller gibi farklı sistemler uygulanmıştır (Jaspart ve ark., 2007; Yang ve ark., 2009; El-Sherbiny ve ark., 2010). Mikropartiküllerin kullanımı, daha yüksek stabiliteleri, daha yüksek ilaç yükleme kapasitesi, daha yavaş ilaç salımı ve yüklerin daha uzun farmakolojik aktivitesi nedeniyle lipozomlar gibi diğer taşıyıcılara göre potansiyel avantajlar sunar. Ayrıca, morfoloji, boyut ve gözeneklilik gibi Mikropartikül özellikleri, pulmoner uygulama gereksinimlerini karşılamak için kolayca uyarlanabilir. Lokal uygulamalarda mikropartikülleri gerekli bölgeye uygulamak için partikül büyüklüğünü gerekli boyutlarda ayarlamak önemlidir:

- 30 µm'den büyük mikropartiküller burun içinde 1-1,5 cm mesafede
- 10 µm'den büyük mikropartiküller ağız, burun ve nefes borusunda
- 10 µm'den küçük mikropartiküller broşlara ve akciğerin alt kısımlarına

- 5-10 µm aralığındaki mikropartiküller bronş ağacının ilk dallanmalarında
- 5 µm daha küçük mikropartiküller son dallanmalarında birikirler (El-Sherbiny ve ark., 2015)

2.7. Mikropartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Şimdiye kadar, doğal polimerler (albümin, karajenan, kitosan (CS), jelatin, hyaluronik asit (HA)), sentetik polimerler (poli (laktik asit), oligo (laktik asit), poli (vinil alkol), akrilik asit türevleri) ve kopolimerler (poli (laktik-ko-glikolid asit) (PLGA)) de dahil olmak üzere, pulmoner ilaç iletimi için taşıyıcı olarak büyük miktarda polimerik malzeme incelenmiştir (Smyth ve ark., 2011). Uygun polimer için tarama yapılırken, biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik dikkate alınması gereken başlıca özelliklerdir (Pilcer ve ark., 2010). Farklı polimerler arasında, CS, HA ve PLGA'nın sıklıkla umut verici beklentilere sahip olduğu raporlanmaktadır.

2.7.1. Kitosan

Pulmoner uygulamalar için hazırlanan Mikropartiküllerde en yaygın olarak kullanılan doğal polimerlerden biri olan kitosanın, ilaç emilimini iyileştirebilmesi ve salınımı kontrol edebilmesi beklenmektedir. Dahası, pulmoner biriktirme için kuru toz formülasyonlarında bir dispersiyon arttırıcı olarak işlev görebilir. Çeşitli literatürlerde kitosan ve tripolifosfat ile iyonik jelleştirme yöntemi ile hazırlanan partiküllerde, kitosan miktarı artırılarak ilaç salım hızının düştüğünü bulmuştur. Bununla birlikte, kitosan agregasyona eğilimlidir ve pKa değeri 5.5-6.5 olduğundan, fizyolojik pH'ta yüzey yükü azalır ve pulmoner ilaç verme uygulamasını sınırlar. Nötr ortamda kitosanın çözünürlüğünü iyileştirmek için kimyasal modifikasyonları geliştirilmiştir. Örneğin, glikol kitosanın (GCS) yeni bir tiyomer türevi, tioglikolik asit (TGA) ile birleştirilerek sentezlendi, GCS-TGA nanopartiküller, TGA'sız nanopartiküller ile karşılaştırıldığında sıçanlarda intratrakeal uygulamadan sonra akciğer dokusuna muko yapışmada iki kat artışa neden olduğu görüntülenmiştir. Kalsitonin yüklü GCS ve GCS-TGA nanopartiküller, sırasıyla %27 ve %40'luk farmakolojik kullanılabilirlik ile en az 12 ve 24 saat boyunca belirgin bir hipokalsemik etki ile sonuçlanmıştır. Bir araştırmada yeni bir norkantharidin-konjuge hidroksipropiltrimetil amonyum klorür kitosan türevi (NCTD-HACC'ler) sentezledi ve NCTD'nin ilk aşamada hızlı salınım ve daha sonra yavaş salınımla iki fazlı bir ilaç salım modeli ayarlandığı gösterilmiştir. (Liang ve ark., 2015)

2.7.2. Hiyalüronik Asit

Son yıllarda hiyalüronik asit, sürekli solunum yolu uygulaması üzerinde çalışan bilim adamlarının dikkatini çekti. Akciğer ortamına endojenliği ve yüksek moleküler ağırlıklı hiyalüronik asitin biyo-yapışmasının yanı sıra, çeşitli enflamatuvar araçlarda ve alveolar makrofajların aglütinasyonunda rolleri vardır; örneğin fagositozu engellemektedir. Ayrıca, sadece *in vitro* olarak değil, aynı zamanda hayvanlarda ve insanlarda da önemli akciğer hastalıklarının tedavisinde önerilmiştir (Allegra ve ark., 2012). Rouse ve arkadaşları hiyaluronik asitin flutikazon propiyonat partiküllerinin yüzeyi üzerindeki etkileşimini ve adsorpsiyonunu araştırdı ve adsorbsiyon kapsamının solüsyondaki HA konformasyonundan etkilendiğini buldu. Ayrıca hiyalüronik asitin akciğerlere kuru toz formülasyonu olarak uygulandığında insülin salımını uzatmak için kullanılabileceği de biliniyor (Surendrakumar ve ark., 2003).

2.7.3. Polilaktik-ko-glikolik asit

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), pulmoner uygulamada sürekli salımlı mikropartiküllerin hazırlanması için en çok araştırılan polimerdir (Ungaro ve ark., 2012; Chow ve ark. 2007). PLGA biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir. PLGA, *in vitro* olarak birçok insan hava yolu hücre hattına karşı toksisite göstermemektedir ve farelerde *in vivo* pulmoner hedeflendirmeden sonra güvenlik göstergesi verilmiştir (Ungaro ve ark., 2012; Dailey ve ark. 2006). Bununla birlikte, FDA, PLGA'yı inhalasyon için polimer olarak henüz onaylamamıştır. PLGA'nın biyoparçalanma hızı molekül ağırlığına ve laktik asit: glikolik asit kütle oranına bağlı olarak 3 haftadan bir yıla kadar olabilir. Polimerik mikropartiküller, partikül formülasyon yöntemine göre hem hidrofilik hem de lipofilik bileşikleri kapsülleyebilir.

Bununla birlikte, PLGA ile hazırlanan mikropartiküller doğal sınırlamalar gösterir. Bunlar arasında sınırlı ilaç yüklemesi, ilacın patlama salımı, akciğerlerde polimer birikmesi riski ve ilaç stabilitesine elverişsiz ortam sayılabilir. Polimerik parçacıklar klasik olarak maksimum %10 ilaç yüklenmesi sergiler, bu da sadece nispeten düşük dozlu ilaçlara uygulanabilecekleri anlamına gelir. Aslında, bir inhalasyonda solunabilecek kütle yükleri kuru toz soluma cihazına bağlı olarak 25 veya 50 mg ile sınırlıdır. İlacın ilk patlama salımı, partikül yüzeyinden ilaç difüzyonundan ve müteakip polimer kütesinin hidrolitik bozunmasından ve sürekli devam eden ilaç

salımından kaynaklanır. Partikül gözenekliliği, salım ortamı ile hemen temas halinde partikül yüzeyini arttırır ve bu da ilk patlamayı arttırır. İlaç yükünün %50'sinden fazlası birkaç saat içinde salınabilir ve formülasyonun optimizasyonu ile bu patlamanın en aza indirilmesi gerekir. Akciğerler içinde polimer birikimi, ilacın salınması polimerin tamamen parçalanmasından daha kısa süreler boyunca devam edebileceğinden ortaya çıkabilir. PLGA'nın parçalanması, peptitler veya proteinler gibi pH'a duyarlı ilaçlara zarar verebilen asidik bir çekirdek oluşturabilir (Cristina ve ark 2014).

2.8. Mikropartikül Hazırlama Yöntemleri

Mikropartikül hazırlama yöntemlerinin birçoğu, üç temel tekniğin varyasyonudur:

- Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi
- Faz ayırma (koaservasyon) yöntemi
- Püskürterek kurutma yöntemi

Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma ve püskürterek kurutma yöntemleri çeşitli araştırmacılar tarafından çok ayrıntılı bir şekilde ele alınmıştır. Bunlar, biyolojik olarak parçalanabilen mikropartiküllerin hazırlanmasında en popüler yöntemlerdir.

Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yönteminde, ilaç bir organik polimer çözeltisi içinde çözülür, dağıtılır veya emülsiyon haline getirilir ve bu daha sonra harici bir su veya yağ fazına emülsifiye edilir. Mikropartiküller, çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma ve polimer çökeltilmesinden sonra oluşturulur.

Faz ayırma yönteminde, polimer, çözünmez bir maddenin genişlemesi yoluyla ayrı bir koaservasyon ajanı yardımıyla çökeltilir. Bu yöntemle mikropartiküller hazırlanırken formülasyonda çözücü veya koaservasyon ajanı kalıntısının kalma ihtimali vardır. Aynı zamanda diğer Mikropartikül hazırlama yöntemleriyle kıyaslandığında daha büyük mikropartiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Lee ve ark., 2010).

Püskürtmeli kurutma, bir sıvının bir sıcak havada veya bir inert gazda, nitrojen akımında atomize edildiği ve hemen kuru bir toz elde edildiği bir işlemdir. Püskürtmeli kurutma işlemi, esas olarak, malzemeyi beslemeye başlama niteliğine ve çalışma koşullarına bağlı olarak, orta derecede dar bir parçacık boyutu dağılımına sahip

parçacıklar üretir. Son zamanlarda, çeşitli aktif farmasötik ürünlerin kapsüllemesi için yaygın olarak farklı yeni varyasyonlar kullanılmaktadır. Çeşitli mikropartikül özellikleri üzerindeki birçok formülasyon ve proses parametresi üzerindeki etki yoğun bir şekilde incelenmiştir (Deshmukh ve ark., 2016).

2.8.1. Çözücü Ekstraksiyon/Buharlaştırma Yöntemi

Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemiyle bir ilacın mikrokapsüllemesine yönelik farklı yöntemler vardır. Etken madde, tek emülsiyon veya çeşitli emülsiyon teknikleriyle polimerik malzemede kapsüllenebilir. Şema seçimi, ilacın daha yüksek düzenlemesini polimerik Mikropartiküllerde kapsüllenecek ilacın hidrofilikliğine ve hidrofobikliğine bağlıdır. Farklı şemalarda Çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemleri aşağıda verilmiştir:

- Su içinde yağ (Y/S) çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi
- Su içinde yağ içinde su (S/Y/S) çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi
- Su içinde yağ içinde katı (K/Y/S) çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi
- Su içinde yağ içinde yağ (Y/Y/S) çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi
- Yağ içinde yağ (Y/Y) çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi

Tek emülsiyon yönteminde, başlangıçta polimerik destek malzemesi uçucu organik çözücü içinde çözülür. Kapsüllenecek aktif farmasötik bileşen daha sonra bir süspansiyon, bir emülsiyon veya bir çözelti oluşturmak için organik çözelti içinde çözündürülür. Bir sonraki aşamada, organik faz, uygun miktarda yüzey aktif madde (stabilizatör) içeren organik çözücü ile karışmayan polimerlerin bir çözücüsünden oluşan bir saçılma fazında çalkalama altında emülsifiye edilir. Emülsiyon stabilize edildikten sonra organik çözücüyü buharlaştırmak için karıştırmaya devam edildi. Mikropartiküller, sertleştirici ajan ile yıkanır, kurutulur ve daha ileri çalışmalar için toplanır. Çeşitli emülsiyonlar, bir iç sulu aşamayı tutan yağ damlalarının harici bir sulu fazdan ayrıldığı üç aşamalı sistemlerdir. Genel olarak, kloroform, diklorometan, etil asetat ve etil format, çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi ile mikropartikül hazırlanma işleminde yaygın olarak kullanılan çözücülerdir (Li ve ark., 2008).

2.9. Mikropartiküllerde Yapılan Kontroller

2.9.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyali

Partiküllerin büyüklüğü, hazırlanacak olan formülasyonun ulaşacağı bölgeye, dağılımına, biyoyararlanımına ve diğer birçok şeye etki eden faktörlerin başında gelir. Örneğin tozların partikül büyüklüğünü değiştirmekle spesifik yüzey alanlarını da ayarlaya bilmekte ve buna bağlı olarak formülasyonun vücut sıvılarında çözünme hızı ve absorpsiyonu da etkilenmektedir. Partikül büyüklüğü ve PDI değerleri, hazırlanacak olan formülasyonun amaca uygun hale getirilmesinde, ilaç dozunun doğru yapılması, açısından önemlidir. Partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinin tespit edilmesi için, lazer difraksiyonu, coulter counter, optik mikroskop yöntemi ve dinamik ışık saçılımı gibi yöntemler sıkça kullanılmaktadır.

2.9.1.1. Zetasizer Nano ZS

Zetasizer Nano ZS, kolloid, nano ve mikro partiküllerin zeta potansiyel ölçümü yanı sıra partikül büyüklüğü ve dağılımını da ölçmeye olanak sağlamaktadır. Bu cihaz dinamik ışık saçılım tekniği kullanarak yüksek performansla sahip çift açılı ve patentli NIBS teknolojisi sayesinde topaklı numuneleri bile tespit etme, küçük veya seyreltik partikülleri belirleme, çok düşük veya yüksek konsantrasyonlu örneklerin analizlerini kolayca gerçekleştirebilmektedir. Yüksek viskoziteye veya konsantrasyona sahip numuneler için özel kuvvetler, tek kullanımlık kuvvetler ve katı yüzeylerin zeta potansiyel ölçümlerini ölçmek için özel kuvvetler mevcuttur. Özel teknolojisi sayesinde 0.3nm-10µm boyut arasındaki partikülleri analiz edebilmektedir.



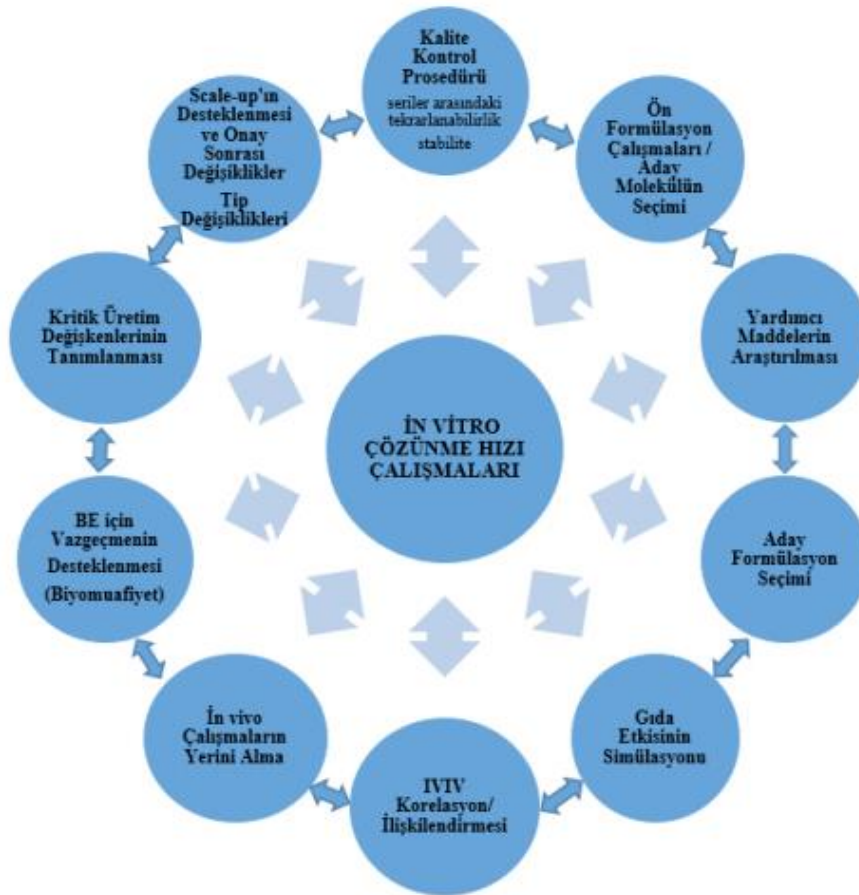
Şekil 2-7: Malvern Zetasizer Nano ZS

2.9.2. Mikropartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Hazır mikropartiküllerin dış özelliklerinin belirlenmesi taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımıyla yapılmaktadır. Çalışmamızda SEM kullanılarak mikropartiküllerin gözenek yapıları ve küresel şekilleri incelenmiştir.

2.9.3. Çözünme Hızı

İn vitro çözünme hızı testleri, ilaç geliştirme aşamasında formülasyon faktörlerinin biyoyararlanıma etkisini test etmekte kullanılan ilacın performansını ortaya koyan başlıca faktörlerdendir. İn vitro çözünme hızı testlerinin formülasyon geliştirmenin farklı aşamalarıyla bağlantılı olarak kullanılmaktadır (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: İn vitro çözünme hızı çalışmalarının kullanım şeması (Usta ve ark., 2015)

Hazırlanmış formülasyonun çözünme hızını gösterebilmek için farklı kinetik modeller hazırlanmıştır. Dozaj formu, kristal özelliği, polimorfik özelliği, çözünürlüğü,

partikül büyüklüğü, dozaj formunun içerdiği etkin madde miktarı salım kinetiğine etki edebilen faktörlerdendir (Siepmann ve ark., 2012).

2.9.4. Çözünme Hızı Verilerinin Kinetik Değerlendirilmesi

ABD Gıda ve İlaç Ajansı (FDA), ilaç şirketlerini *in vivo* ilaç biyoyararlanımı ile *in vitro* çözünme arasındaki ilişkiyi incelemeye teşvik etmektedir. Bu nedenle, yıllar boyunca, *in vitro* çözünme testi, farmasötik geliştirme ve üretimde kritik bir rol oynamış, genellikle yeni formülasyonların tasarımına ve daha verimli dozaj formlarının geliştirilmesine rehberlik etmiştir (Baxter ve ark., 2005). *In vitro* çözünme profillerini *in vivo* biyoyararlanımın, biyoeşdeğerliğin göstergeleri olarak kullanmak veya *in vitro-in vivo* korelasyonları geliştirmek için, tanımlanmış fizyokimyasal ve hidrodinamik koşullarda elde edilen güvenilir salım verileri gereklidir. Çözünme hızı çalışmaları yaparken genellikle etkin maddenin kümülatif profili kullanılmaktadır. Çözünme hızı profillerinin karşılaştırılırken, modele bağlı, istatistik analizlerin yanı sıra modelden bağımsız metotlar da kullanılabilir.

2.10. İn Vitro Performans Analizleri

2.10.1. DUSA Analizi

Birden fazla doz içeren inhalerler için, tüm içerikler üzerinde doz içeriği homojenliği için bir test gereklidir. Test ayrıca ürün etiketi tarafından talep edilen toplam deşarjları da ölçer. Kullanılan numune toplama sistemi Dozaj Birimi Numune Alma Aparatı (DUSA) toplama tüpüdür. Birincil parçalar, bir ince partikül filtre tutucusu, yan basınç musluğuna sahip ana oda, uç kapak setleri (katı ve vakum hortumu bağlantılı), conta contaları ve tercih edilen ağız parçası adaptörünü tutmak için bir giriş içerir.

DUSA analizi, cihazdan yayılan ve dolayısıyla hasta için mevcut olan toplam ilaç miktarı olan Teslim Edilen Dozun miktarının ölçülmesini sağlar. Her dozun toz ağırlığı, ağırlık farkı olarak analitik bir teraziyle ölçülür. Dozu yakaladıktan sonra, aktif ilaç çözücü içinde çözülür ve sonra çözeltinin bir kısmı UV kullanılarak analiz edilir.



Şekil 2-9: DUSA cihazı

2.10.2. NGI analizi

Next Generation Impactor (NGI), 2000 yılında piyasaya sürülmüştür. Cihaz, yedi aşama ve bir mikro-delik toplayıcı (MOC) içeren, yüksek performanslı, hassas, partikülleri fraksiyonlarına ayıran bir ayrıştırıcıdır (Şekil 2.9.). Sağladığı kullanım esnekliği ve yüksek verim sayesinde inhaler araştırma laboratuvarında yaygın olarak tercih edilmektedir. Partikül sınıflandırma işlemini iyileştirmek üzere tasarlanan yeni aksesuarların eklenmesi ile tekrarlanabilirlik ve verimlilik artmaktadır.

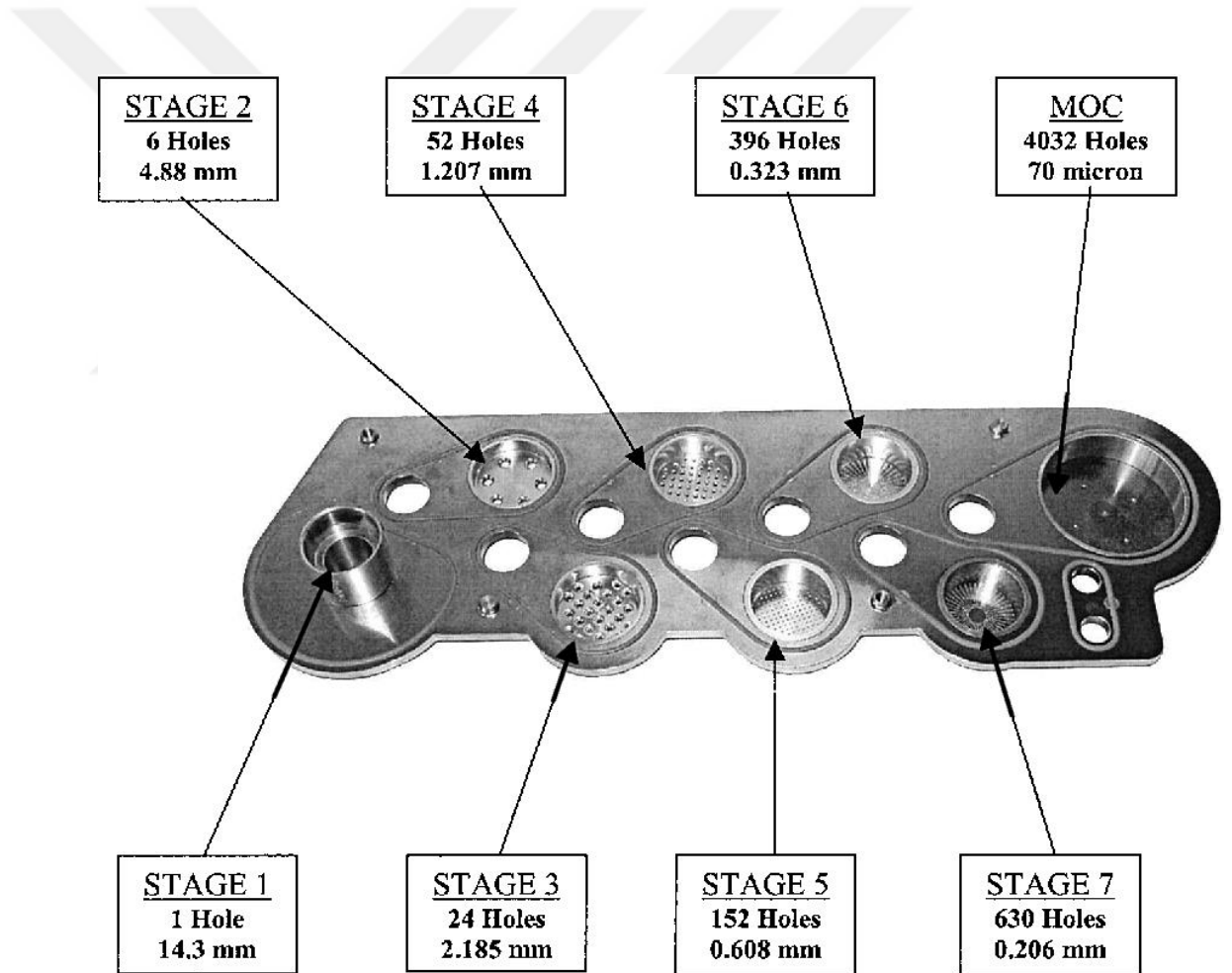
NGI analizi, kademeli çarpma tertibatını sınıflandıran yüksek performanslı bir analizdir. Hava akımı, tozu, çarpma tertibatının çeşitli aşamaları içinde kademeli olarak azaltılmış bir çapa sahip olan bir dizi ağızlık boyunca taşır. Çeşitli aşamalarda biriktirilen ilacın miktarını analiz ederek dikkate alınan en önemli parametreler toplam veya hesaplanan teslim edilen doz (TED), ince parçacık kütlesi (FPM) ve kütle medyan aerodinamik çapıdır (MMAD). FPM, partikül büyüklüğünün 5 μ m'nin altında olduğu ilaç miktarını temsil eder. DUSA testinin yanı sıra, tüm inhalasyon aralığında çekilen farklı çekimlerde analizler yapılır.



Şekil 2-10: NGI cihazı

Next Generation Impactor özellikleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- ✓ İlaç endüstrisine özgül olarak tasarlanmıştır.
- ✓ Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri Farmakopelerine kayıtlı bir yöntemdir.
- ✓ Partikül büyüklüğü aralığı akış hızına bağlı olarak 0,24- 11,7 μm arasında.
- ✓ 15- 100 L/dk. arasındaki akış hızlarında çalışmak mümkündür.
- ✓ Verim, doğruluk ve tekrarlanabilirlik kapasitesi yüksektir.
- ✓ Aşamalar arası kayıplar az olduğu için ilaç geri kazanımı yüksektir.
- ✓ Yarı ve tam otomasyona uygundur.



Şekil 2-11: NGI cihazının partikülleri ayırma bölümleri

2.11. Akciğer Enfeksiyonları

Oral ve parenteral tedavi yöntemleriyle erişimin sınırlı olduğu derin pulmoner bölgelere yerleşen bakteriler nedeniyle Akciğer enfeksiyonlarının tedavisi zordur. Enfeksiyonun yerleştiği alanlarda minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) oluşturabilen sistemik doz çok yüksektir. Garonzik ve arkadaşlarının 2011 yılında kolistin kullanarak yaptığı bir çalışmada akciğerdeki enfekte olmuş bölgeyi tedavi etmek için kullanılan sistemik dozun hastaların %60'ında nörotoksisite ve nefrotoksisiteye yarata bileceği belirtilmiştir (Garonzik ve ark., 2011).

İnhaler antibiyotik preparatlarının çoğu, kistik fibroz benzeri kronik otozomal resesif multisistemik hastalık olan ve tekrarlayan akciğer enfeksiyonlarına yol açan bilen akciğer hastalıklarına odaklanır. Özellikle, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) veya kistik fibroz gibi mukosilyer klirens oranını azaltan hastalıklar ciddi enfeksiyonlara neden olur. Sonuç olarak, alt solunum yolu enfeksiyonları, kistik fibrozlu veya kistik fibrozsuz tüm bronşektazi hastaları arasında en önemli morbidite ve mortalite nedeni haline gelmektedir.

Pulmoner yolla verilen antibiyotikler, solunum yolu bakteriyel yoğunluğunu azaltarak da enfeksiyon veya kronik kolonizasyon önleme sağlayabilmekte ve semptomları azaltabilmektedir. Akciğerleri enfekte olmuş hastaların çoğu uzun süreli sistematik antibiyotik tedavisine maruz kalmaktadır. Bu tedavi fiziksel iyileşme sağlamasına rağmen, bazı antibiyotiklerin aşırı duyarlılığına, bakteriyel direncin artmasına veya mantar süperenfeksiyonlarına neden olabilmektedir (Cookson ve ark., 2018).

2.12. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, kistik fibrozis hastalarının hava yollarını kolonize eden ve enfekte eden ilk patojenlerden biridir. Pre-antibiyotik çağda, *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının bir sonucu olarak birçok KF'li çocuk öldürmüştür. Günümüzde antibiyotik tedavisi nedeniyle, KF'deki *Staphylococcus aureus* enfeksiyonları yönetilebilir görünmektedir. *Staphylococcus aureus*, çocuklarda ve ergenlerde en yaygın patojendir ve sıklıkla daha sonra yerini *Pseudomonas aeruginosa* almıştır. Bununla birlikte, yetişkinlerin hala %40'ı *Staphylococcus aureus* tarafından kolonize veya enfekte kalır. *Staphylococcus aureus* KF hastalarında bu kadar yaygın bir patojen

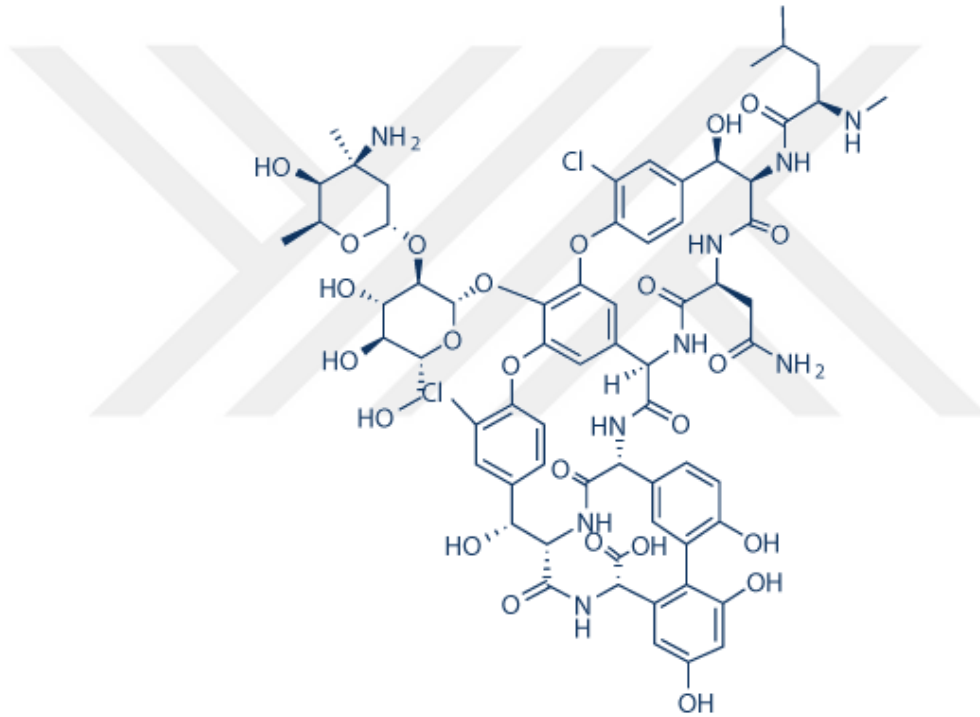
olmasına rağmen, birçok çözülmemiş sorun vardır. Son veriler sadece ABD'de değil, Avrupa'da da KF popülasyonunda *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarında artış olduğunu ve MRSA suşlarının arttığını göstermektedir (Razvi ve ark., 2009). Özellikle hastane tabanlı MRSA enfeksiyonların bakterilerin, akciğerlerin derin katlarına inmesi sistemik dolaşımdan uygulanan antibiyotiklerin dozunun yüksek olmasını gerektirmektedir. Bu da gerekli olan MIC değerlerinin yükselmesine ve böbreklerde nefrotoksisiteye neden olmaktadır. Vankomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonları için onlarca yıldır en yaygın tedavi olmuştur; bununla birlikte, etkinliği hakkındaki endişeler ve MIC değerlerinin yükselmesi özellikle hastane tabanlı MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde lokal uygulanacak ilaç formülasyonlarının geliştirilmesine ihtiyaç yaratmaktadır (Holmes ve ark., 2014).

2.13. İnhalasyon Antibiyotikler

Oral antibiyotiklerin uygulanması, bağırsak mikrobiyal topluluklarında uzun süreli olumsuz değişikliklere neden olabilir, bu da bağırsak organizmalarının antimikrobiyallere maruziyetini azaltmanın veya bunlardan kaçınmanın önemli faydalarının olabileceğini göstermektedir (Zaura ve ark., 2015). İnhalasyonlar tıbbi olarak iki bin yıldır kullanılmaktadır ve çok çeşitli aerosol ilaçları şu anda kullanımdadır veya birçok hastalık için geliştirilmektedir. Akciğer enfeksiyonları için antibiyotiklerin (genellikle toz halinde) pulmoner dağıtımı, daha az doz uygulaması ve yan etkilerdeki azalmalar ile başarı göstermiştir (Traini ve ark., 2009). Aerosolize antibiyotikler, pnömoni tedavisinde sistemik muadillerinden daha etkili olabilir (Palmer ve ark., 2014). Kistik fibrozda inatçı hava yolu enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanıldığında, solunan antibiyotikler oral veya parenteral tedaviden daha etkili görünmektedir. (Ryan ve ark., 2011) Sınırlı bir antibiyotik yelpazesi halihazırda inhalasyon için pazarlanmaktadır ve FDA ve Avrupa İlaç Ajansı tarafından kistik fibrozda kullanım için onaylanmıştır. Bunlara tobramisin, kolistin ve nebulize aztreonam dahildir. Diğer hastalıklar için onaylanmamış olmasına rağmen, gentamisin, tobramisin, amikasin, seftazidim ve amfoterisin enjekte edilebilir formülasyonları şu anda kistik olmayan fibrozis bronşektazi, ilaca dirençli tüberküloz olmayan mikobakteriyel enfeksiyonlar, nakil sonrası oluşan hava yolu enfeksiyonlarını yönetmek için 'etiket dışı' nebulize edilmektedir (Quon ve ark., 2014).

2.13.1. Vankomisin

Vankomisin, yaklaşık 50 yıl önce penisilinaz üreten *Staphylococcus aureus* suşlarını tedavi etmek için alternatif bir penisilin olarak geliştirilmiş, orijinal olarak *Streptococcus orientalis* organizmasından türetilen bir trisiklik glikopeptid antibiyotiktir. Vankomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) dahil olmak üzere gram pozitif bakterilerin neden olduğu çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesi için kullanılır. Ayrıca streptokoklar, enterokoklar ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) enfeksiyonları için etkilidir. Vankomisinin çok sayıda FDA onaylı ve etiket dışı klinik kullanımı vardır.



Şekil 2-12: Vankomisin kimyasal yapı gösterimi (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi 2020)

Vankomisin MRSA içeren ciddi Gram-pozitif enfeksiyonların tedavisinde dünyada en yaygın kullanılan antibiyotiklerden biridir. Metisiline dirençli stafilokok türlerinin sıklığının artması, çeşitli hasta popülasyonlarında Vankomisin'in daha yaygın kullanımına yol açmıştır. Serum konsantrasyonları ile belirli bir klinik yanıt arasında net bir ilişki olmamasına rağmen, Vankomisin dozu genellikle 20–40 mg/L'lik en yüksek serum konsantrasyonları ve 5–10 mg/L'lik en düşük serum konsantrasyonları elde

edilecek şekilde titre edilir. Düşük konsantrasyonlar daha az etkili tedavi ve bakteriyel direnç için artan bir eğilimle sonuçlanabilirken, yüksek konsantrasyonların nefrotoksisite ve ototoksisite ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (De Hoog ve ark., 2005). Vankomisinin farmakokinetiği ilk olarak parametrik olmayan yaklaşımlarla incelenmiştir. Bu çalışmalar, hastalardaki vankomisinin eğilimini karakterize etmeye ve serum konsantrasyonları ile terapötik ve yan etkiler arasındaki ilişkiyi değerlendirmeye odaklanmıştır (Matzke ve ark., 1986). Gastrointestinal sistemde absorpsiyon ihmal edilebilir düzeydedir ve oral uygulama yalnızca stafilokok veya klostridiyal diyaresi olan hastalar için uygundur. İnsan serum proteinlerine bağlanma seviyesi, esas olarak albümin ve Immunoglobulin A'ya %55'tir. Sıvılarda doku dağılımı oldukça iyidir. Vankomisin çoğu vücut boşluğuna nüfuz eder, ancak elde edilen konsantrasyonlar değişkendir ve mevcut inflamasyon derecesine bir şekilde bağlıdır. Bir Vankomisin dozunun %80'inden fazlası, uygulamadan sonraki 24 saat içinde idrarla değişmeden atılır. Nedeni bilinmeyen böbrek dışı mekanizmalarla küçük bir miktar elimine edilir. Normal böbrek fonksiyonu olan kişilerde eliminasyon yarılanma ömrü 3 ila 9 saat arasında değişir. Bu, vankomisin farmakokinetiğindeki değişkenliği etkileyen faktörlerin daha dikkatli bir şekilde incelenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu sorunu gidermek için çeşitli hasta popülasyonlarında kapsamlı farmakokinetik çalışmalar yapılmıştır. Özellikle, yaygın olarak kullanılan bir popülasyon tabanlı modelleme yaklaşımı olan doğrusal olmayan karma etki modellemesi, doz-konsantrasyon ilişkisini etkileyebilecek ortak değişkenleri tanımlamak için kullanılmıştır (Marsot ve ark., 2012).

FDA onaylı Vankomisinin Klinik Kullanımları:

- *Clostridium difficile* ile ilişkili ishal (oral uygulama)
- *Staphylococcus enterokolit*
- Psödomembranöz kolit
- Endokardit: *Difteroid*, *Enterokok*, *Stafilokok* ve *Streptokokal* türler
- Stafilokok enfeksiyonları: sepsisemi, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, kemik enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları vb.

Vankomisin, bakteriyel hücre duvarındaki peptidoglikanların polimerizasyonunu inhibe ederek bakterisidal etkisini gösteren bir glikopeptid antibiyotiktir. Bakteriyel hücre duvarı, uzun N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin polimerlerinden oluşan

yüksek oranda çapraz bağlı bir yapıya sahip sert bir peptidoglikan tabakası içerir. Vankomisin, glukosiltransferaz ve P-fosfolipid taşıyıcısını inhibe eden D-alanil D-alanine bağlanır, böylece peptidoglikan tabakasında N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin sentezini ve polimerizasyonunu önler. Bu inhibisyon, bakteri hücre duvarlarını zayıflatır ve nihayetinde hücre içi bileşenlerin sızmasına neden olarak bakteriyel hücre ölümüne neden olur. Vankomisin yalnızca gram pozitif bakterilere karşı etkilidir (Lee ve ark., 2019).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Ammonium bikarbonat

Diklorometan

Distille su

HPMC kapsül

InhaLac® 230

Lactohale® 200

Laktoz

PBS tablet

PLGA (RG 502 h)

PLGA (RG 503)

PLGA (RG 504)

Polietilen glikol

PVA 13000-27000

Respitose® ml003

Respitose® sv003

Sert jelatin kapsül

Sodyum bikarbonat

Sodyum karbonat

Sukroz

Trehaloz

Vankomisin HCl

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Homojenizatör (İKA, Almanya)

Liyofilizatör (Virtis, ABD)

Manyetik karıştırıcı (İKA, Almanya)

Orbital çalkalayıcı (Thermo Electron Corporation, ABD)

Santrifüj (Allegra x-22r, Beckman coulter, ABD)

Taramalı elektron mikroskopu (sem) (Quanta 450 FEG, FEI microscopes, ABD)

Ultrasonik banyo (Sonorex, Bandelin, Almanya)

Ultrasonik Homojenizatör (Sonics, ABD)

UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu Euro, Almanya)

Vortex (Genius 3, IKA, Almanya)

Zetasizer nano ZS (Malvern, İngiltere)

Taramalı elektrom mikroskopu (Hitachi, Japonya)

NGI (Copley, İngiltere)

DUSA (Copley, İngiltere)

3.2. Etken Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1. Etken Maddenin Ultra Viole (UV-Vis) Spektrofotometresi ile Analizi

Vankomisin hidroklorürün distille su içerisinde farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan çözeltilerin UV-Vis spektrofotometresinde 200-700 nm arasında spektrumları alınarak, maksimum absorbens gösterdiği dalga boyları ($\lambda_{\max}$) tespit edilmiştir.

3.2.2. Etken Maddenin Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması

Vankomisin hidroklorürün, distile su içerisindeki 1 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış, daha sonra bu stoktan çözeltiden seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, $\mu\text{g/ml}$) çözeltiler hazırlanmıştır.

Hazırlanan farklı çözeltilerin absorbens değerleri vankomisin hidroklorürün maksimum absorbens verdiği dalga boyu olan 280 nm’ de okunmuştur. Okunan çözeltinin konsantrasyon değeri olan “x” ve buna karşılık gelen absorbens değeri “y” kullanılarak kalibrasyon doğrusu denklemi oluşturularak, grafiği çizilmiştir. Daha sonra yapılan analizlerde ve *in vitro* çözünme hızı testlerinde etkin maddenin miktar tayinleri için bu doğru denklemi kullanılmıştır.

3.2.3. Kalibrasyon Doğrularının Analitik Validasyonu

Analitik yöntemlerin validasyonu, analizler için gerek duyulan şartları sağlayan yöntemin performans özelliklerinin yapılan ölçümlerle belirlenmesidir. Miktar tayinini metodlarının performans özellikleri aşağıdaki parametrelerle açıklanmaktadır (ICHQ2(R1)):

- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Ara kesinlik
- Seçicilik
- Teşhis sınırı
- Tayin sınırı

3.2.3.1. Doğrusallık

Doğrusallık verilen aralık içerisinde, numunedeki madde konsantrasyonu ile test sonuçlarının doğru orantı sağlayabilmesidir. Doğrusallığın belirlenmesinde en az 6 konsantrasyon gereklidir. Eğer doğrusal bir ilişki varsa, analiz sonuçları, regresyon doğrusunun en küçük kareler yöntemiyle hesaplanması gibi metotlarla değerlendirilebilmektedir. Regresyon katsayısı, regresyon doğrusunun eğimi, y-kesişim ve artık kareler toplamı hesaplanmalıdır (ICHQ2(R1)). Parametrelerin hesaplanmasında Microsoft Excel programından yararlanılmıştır.

Distile su içerisinde 1 mg/ml konsantrasyonda 100 ml hazırlanmış etkin maddenin stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak 8 farklı konsantrasyonda çözeltiler elde edilmiştir. Bu çözeltilerin 280 nm'deki absorbans değerleri okunarak doğrusallık, bu aralığa ait doğrular ve bu doğruların parametreleri hesaplanmıştır.

3.2.3.2. Doğruluk

Kullanılacak olan yöntemle elde edilen sonuçların teorik verilere yakınlığı, o analitik yöntemin doğruluğudur. Analiz edilen etken maddenin bilinen miktar tayini ile % geri elde etme değerleri bulunarak hesaplanır. Doğruluk, belli bir aralığı kapsayan, en az 3 konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan % geri elde kazanımların belirlenmesinden tayin edilmektedir (ICHQ2(R1)).

Vankomisin hidroklorürün distille su içerisindeki 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden 20; 50; 100 µg/ml konsantrasyonlarda 3 farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 280 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Daha sonra yöntemin doğruluğunu % geri kazanma değerlerini çıkartarak hesaplanmıştır.

3.2.3.3. Kesinlik

Yapılacak olan analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten art arda örneklemeyle elde edilen ölçme sonuçlarının yakınlığıdır. Kesinlik normal işlem koşulları altında, yöntemin tekrarlanabilirliğinin, tekrar üretilebilirliğinin ve ara kesinliğinin ölçümüdür (ICH Q2(R1)). Çalışmamızda analitik yöntemin kesinliğini belirlemek için tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik ölçümlerinden yararlanılmıştır.

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralıklarında işlem koşulları aynı olduğunda yöntemin kesinliğini ifade etmektedir. En az üç farklı konsantrasyonun en az üç kez

ölçülmesiyle absorbands değerleri alınmıştır. Daha sonra tekrarlanabilirliğin sonuçları, konsantrasyonların ortalaması, standart sapması (SD) ve % bağıl standart sapması (%RSD) olarak verilir (ICH Q2(R1)). Yöntemin kesinliği için % bağıl standart sapma değerinin %2-nin altında olması gerekmektedir.

Ara kesinliği belirlemek amacıyla bir birin takip eden 2 günde üç farklı konsantrasyonun altışar kez okutması yapılmıştır. Elde edilen absorbands değerlerinden ortalama konsantrasyon (C_{ort}), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (% RSD) değerleri hesaplanmıştır

3.2.3.4. Seçicilik (Özgünlük)

Özgünlük, ölçülecek örneğin yardımcı maddeler ve çözücülerin varlığındaki miktar tayini için yöntemin uygun olduğunun belirlenmesidir (ICH Q2(R1)). Formülasyonda yer alan yardımcı maddelerin çözeltileri ve boş mikropartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Analiz edilen etken madde ile aralarında aynı dalga boyunda pik verip vermedikleri saptanmıştır.

3.2.3.5. Tehşis Limiti (LOD)

Yapılacak olan analitik yöntemin tehşis sınırı, belirlenmiş koşullar altında örnek içerisindeki analiz edilecek maddenin teşhis edilebilen; ancak tayin edilemeyen en düşük konsantrasyonudur (ICH Q2(R1)). Vankomisin hidroklorürün stok çözeltisinden hazırlanan 6 farklı konsantrasyondaki çözeltilerin 3 er kez 280 nm deki absorbands değerleri ölçülmüştür. Daha sonra elde edilen değerler grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon doğrularının eğim değerinin ortalaması ve kesişim değerinin standart sapması bulunmuş ve denklem 3-1 ile tehşis sınırı hesaplanmıştır.

$$LOD=3,3 \cdot \sigma/s \quad (3-1)$$

σ : regresyon doğrularının
y kesişim değerlerinin standart sapması
s: kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.2.3.6. Miktar Tayini Limiti (LOQ)

Yapılacak olan yöntemin tayin sınırı, örnekteki maddenin uygun doğruluk ve kesinlikte kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük konsantrasyonudur (ICH Q2(R1)).

Vankomisin hidroklorürün stok çözeltisinden hazırlanan 6 farklı konsantrasyondaki çözeltilerin 3 er kez 280 nm deki absorbans değerleri ölçülmüştür. Daha sonra elde edilen değerler grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon doğrularının eğim değerinin ortalaması ve kesişim değerinin standart sapması bulunmuş ve aşağıdaki denklemlerle tayin sınırı hesaplanmıştır.

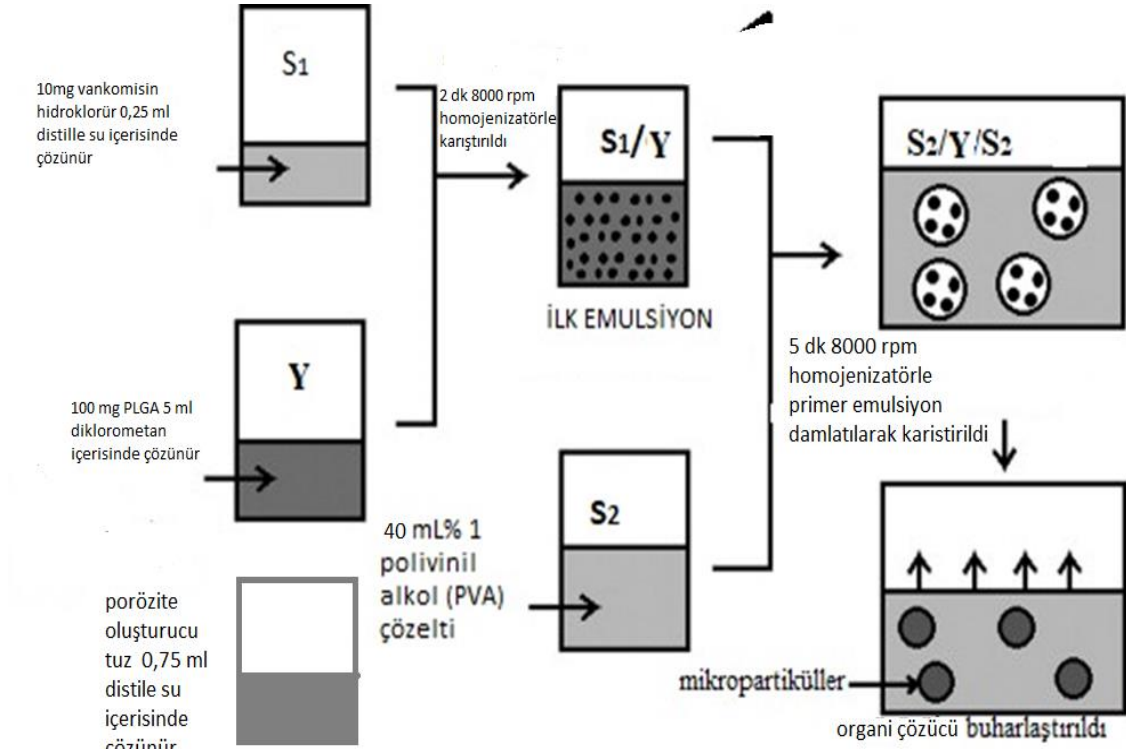
$$LOQ=10 \cdot \sigma / s \quad (3-2)$$

σ : regresyon doğrularının
y kesişim değerlerinin standart sapması
s: kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.3. Mikropartiküllerin Hazırlanması

Vankomisin hidroklorür içeren mikropartiküller emülsiyon çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmıştır. Polimer olarak polilaktik-koglikolik asit (PLGA) kullanılmıştır. Mikropartiküllerin hazırlanmasında S/Y/S emülsiyon çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. 10 mg vankomisin hidroklorür 0,25 ml distile suda çözülmüştür. Organik çözücü olarak 5 ml diklorometan kullanılmıştır. 100mg PLGA organik faz içerisinde çözünmüştür. Daha sonra porözite oluşturmak için seçilen tuzun (amonyum bikarbonat-ABC, sodyum bikarbonat-SBC, sodyum karbonat-SC) %1,5'luk çözeltisi hazırlanmıştır. Etkin madde çözeltisi ve seçilen porözite oluşturucu tuz çözeltisi organik faz üzerine eklenerek homojenizatörde 8000 rpm (devir/dakika) hızında 2 dakika boyunca homojenize edilmiş ve S/Y tipi primer emülsiyon hazırlanmıştır. Dış faz olarak %1 (a/h) konsantrasyonda 40 ml PVA çözeltisi kullanılmıştır. Oluşturulan primer emülsiyon PVA çözeltisine eklenerek 8000 rpm'de 5 dakika homojenize edilmiştir. Oluşturulan S/Y/S tipi emülsiyon, organik çözücünün buharlaşmasını sağlamak üzere manyetik karıştırıcıda 450 rpm hızında 24 saat karıştırılmıştır. Hazırlanan formülasyonlardan 2 ml partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel testi için ayrıldıktan sonra 9000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve mikropartiküller distile su ile 3 defa yıkanmıştır. Çöken partiküller tekrar 5ml distile su içinde disperse edilerek dondurulmuş ve 48 saat liyofilize

edilmiştir. Elde edilen toz mikropartiküller ağızı kapalı tüplerde, buzdolabında saklanmıştır. Mikropartiküllerin hazırlanmasına ait şema aşağıda verilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3-1: Poröz mikropartiküllerin hazırlanma mekanizması

3.3.1. Önformülasyon Çalışmaları

3.3.1.1. Etken Madde Yükleme Çalışmaları

S/Y/S emülsiyon çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan mikropartiküllere en verimli etken madde yüklemesini yapabilmek için önformülasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada Tablo 3-1’de gösterilen formülasyonlar hazırlanarak incelenmiştir.

Tablo 3-1: Vankomisin HCl yüklemesi yapılan önformülasyon çalışmaları

Formülasyon	PLGA (mg)	Vankomisin HCl (mg)	ABC (mg)
V-0	100	0	7,5
V-5	100	5	7,5
V-10	100	10	7,5
V-15	100	15	7,5

ABC: Amonyum Bikarbonat

3.3.1.2. Farklı Polimerlerle Yapılan Önformülasyon Denemeleri

S/Y/S emülsiyon çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan Mikropartiküllerde PLGA polimerinin farklı molekül ağırlıklarındaki rosomerleri kullanılarak Tablo 3-2’de gösterilen formülasyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği ve ürün verimliliği hesaplanmıştır.

Tablo 3-2: Farklı polimerler kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Formulasyon	PLGA türü	PLGA (mg)	Vankomisin HCl (mg)	ABC (mg)
ÖF-1	RG 504 h	100	10	7,5
ÖF-2	RG 503	100	10	7,5
ÖF-3	RG 502	100	10	7,5

ABC: Amonyum Bikarbonat

3.3.2. Formülasyon Çalışmaları

Önformülasyon çalışmaları sonrasında seçilmiş polimer ve etken madde miktarı üzerinden formülasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Farklı porözite oluşturuca ajanları farklı miktarlarda kullanarak Tablo 3-3’te gösterilen formülasyonlar hazırlanmış ve sonraki aşamalara geçilmiştir.

Tablo 3-3: Hazırlanan formülasyonlar

Formülasyon	POA	POA miktarı (mg)	Vankomisin HCl (mg)	RG 503 (mg)
ABC-0	ABC	7,5	0	100
NOP	-	-	10	100
ABC-5	ABC	5	10	100
ABC-7.5	ABC	7,5	10	100
ABC-10	ABC	10	10	100
SC-5	SC	5	10	100
SC-7.5	SC	7,5	10	100
SC-10	SC	10	10	100
SBC-5	SBC	5	10	100
SBC-7.5	SBC	7,5	10	100
SBC-10	SBC	10	10	100

ABC: Amonyum Bikarbonat; SC: Sodyum Karbonat; SBC: Sodyum Bikarbonat; POA: Porözite Oluşturucu Ajan

3.4. Mikropartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

3.4.1. Partikül Büyüklüğünün Saptanması

Organik çözücü uzaklaştırıldıktan sonra formülasyondan alınmış örnekler 2 dakika vortekslendikten sonra Malvern Zetasizer nano ZS cihazı kullanılarak partikül büyüklüğü ve PDI değerleri ölçülmüştür. Deney 3 defa tekrar edilmiştir.

3.4.2. Mikropartiküllerin Yüzey Yüklerinin Tayini

Organik çözücü uzaklaştırıldıktan sonra formülasyondan alınmış örnekler 30 saniye vortekslendikten sonra Malvern Zetasizer nano ZS cihazı kullanılarak yüzey yükleri belirlenmiştir. Deney 3 defa tekrar edilmiştir.

3.4.3. Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Uygun özelliklere sahip mikropartikül toz formülasyonları seçilerek distile su ile disperse edilmiştir. Daha sonra hazırlanan örnekler taramalı elektron mikroskopunun (SEM) ile görüntülenmiştir.

3.4.4. Mikropartiküle Yüklenen Etken Maddenin Miktar Tayini

Etkin madde içeriğini tespit etmek amacıyla 20 mg mikropartikül tartılarak 5 ml diklorometan ve 5 ml distile su eklenerek tamamen çözününceye kadar 3 dakika vortekslenmiştir. Elde edilen çözelti faz ayrımı oluncaya kadar bekletilmiştir. Daha sonra çözeltinin üst kısmı alınarak UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 280 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Deney 3 defa tekrar edilmiştir.

3.4.5. Etken Maddenin Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

3.4.5.1. İn Direkt Metotla Enkapsülasyon Tayini

İndirekt metotla enkapsülasyon tayini yapmak için organik çözücü uzaklaştırıldıktan sonraki santrifüjleme aşamasında formülasyondan ayrılan süpernatantların her birinden 5 ml örnek alınmıştır. Alınan örneklerdeki vankomisin hidroklorürün UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 280 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüş ve miktarı hesaplanmıştır. Daha sonrasında 3-3'teki denklem yardımıyla in direkt enkapsülasyonları hesaplanmıştır. Deney 3 defa tekrar edilmiştir.

$$\%E=100-C_{\text{sup}}/C_{\text{teorik}}*100 \quad (3-3)$$

%E: İndirekt enkapsülasyon oranı

C_{sup}: Süpernatandaki etkin madde miktarı

C_{teorik}: Teorik olarak yüklenen etkin madde miktarı

3.4.5.2. Direkt Metotla Enkapsülasyon Tayini

Etkin madde içeriğini tespit etmek amacıyla 20 mg mikropartikül tartılarak 5 ml diklorometan ve 5 ml distile su eklenerek tamamen çözününceye kadar 3 dakika vortekslenmiştir. Elde edilen çözelti faz ayrımı oluncaya kadar bekletilmiştir. Daha sonra çözeltinin üst kısmı alınarak UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 280 nm dalga

boyunda absorbands değeri ölçülmüş ve 3-4'teki denkleme göre enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. Deney 3 defa tekrar edilmiştir.

$$\%E = C_y / C_{\text{teorik}} * 100 \quad (3-4)$$

%E: Direkt metotla hesaplanmış enkapsülasyon yüzdesi
 C_y: Yüklenen etkin madde miktarı
 C_{teorik}: Teorik etkin madde miktarı

3.4.6. Ürün Verimi Tayini

Mikropartiküllerin üretim verimi, üretim tamamlandıktan sonra elde edilen mikropartikül miktarının üretim içine kullanılan toplam katı madde miktarına oranlanması ile hesaplanmakta ve yüzde olarak ifade edilmektedir. Deney 3 defa tekrar edilmiştir.

3.4.7. İn Vitro Çözünme Hızı Deneyi

PLGA mikropartiküllerinden vankomisin *in vitro* salım profilleri pH 7.4 fosfat tamponunda incelendi. 2.0 ml çözünme ortamı Eppendorf tüpüne konuldu ve 20 mg vankomisin hidroklorür yüklü mikropartiküller süspanse edildi. Tüpler, 100 ± 1 rpm'de 37 ± 0,5°C'de termostatlanmış forma orbital çalkalayıcıya konuldu. Programlı zaman aralıklarında (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 ve 48 saat) eppendorf tüpler alındı ve 5 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra 0,5 ml numune alınmış ve tüpe aynı miktarda taze ortam eklenmiştir. Numuneler aynı tampon ile seyreltilerek 280 nm'de UV-Vis spektrofotometresinde analiz edilmiştir. Tüm formülasyonlar için *in vitro* salım çalışmaları üç kez tekrar edilmiştir (Cevher ve ark., 2006).

3.4.8. Dondurarak Kurutma ve Stabilizasyon Çalışması

Dondurarak kurutma işleminden önce hazırlanmış mikropartikül formülasyonuna eklenen bir kriyoprotektan hem dondurma sırasındaki agregasyonu engellemekte hem de liyofilizasyon işlemi sonrasındaki stabiliteyi önemli şekilde arttırmaktadır (Wu ve ark. 2019). bilinen bu bilgiler eşliğinde seçilen üç kriyoprotektanın (Laktoz, Sukroz ve Trehaloz) üç farklı oranda (1/1, 1/3, 1/5) seçilmiş formülasyonlarla karıştırılarak donduruldu. Dondurma işlemi -20°C temperaurda 2 saat boyunca gerçekleştirildi. Tamamen dondurulmuş örnekler daha sonrasında liyofilizatöre alındı. 72 saat boyunca liyofilize edilen örnekler daha sonraki stabilite testleri için

toplandı ve nem almayacak şekilde ağızları kaplandıktan sonra dolapta muhafaza edildi. Hazırlanmış örnekler Tablo 3-4’de verilmiştir.

Tablo 3-4: Stabilizasyon çalışması için hazırlanan formülasyon örnekleri

KR		Laktoz			Sukroz			Trehaloz		
MP	MP/KR a/a	1/1	1/3	1/5	1/1	1/3	1/5	1/1	1/3	1/5
ABC-5		AL1	AL3	AL5	AS1	AS3	AS5	AT1	AT3	AT5
SBC-5		SL1	SL3	SL5	SS1	SS3	SS5	ST1	ST3	ST5

MP: Vankomisin hidroklorür mikropartikülleri; KR: Kriyoprotektan; a: ağırlık

Liyofilizatörden çıkartılarak muhafaza edilen örnekler, 1.gün 15.gün 30. gün ve 90.gün olacak şekilde partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirildi.

3.4.9. İn Vitro Performans Testleri

3.4.9.1. NGI Analiz

Kuru tozların aerodinamik özellikleri NGI kaskad çarpma tertibatı ile değerlendirildi. Her bir tozdan yaklaşık 50 mg (1:5 oranında özel hazırlanmış laktoz tozları ile karıştırılarak), HPMC kapsül No 3'e yüklendi. 60 litre/dakikada hava akışını sağlamak için yüksek kapasiteli bir pompa kullanıldı ve hava akışı bir akış ölçerle ölçüldü. Aerolizer® kullanarak kapsül delindikten sonra cihaza yerleştirildi. Her test, cihaz boyunca 4 l hava akışı sağlamak için 4 saniye boyunca yapılmıştır. Her formülasyondan 10 kapsül uygulandıktan sonra, toplanan tozlar 5 ml DCM içinde çözüldü; daha sonra üzerine 5 ml distille su eklenerek DCM uzaklaştırıldı. Toplanan örnekler UV-Vis spektrofotometresi ile analiz edilmiştir. Daha sonra MMAD calculator (2015) kullanılarak aerodinamik özellikler; kütle medyan aerodinamik çapı (MMAD), geometrik standart sapması (GSD), ince partikül fraksiyonu % (% FPF) ve atış başına

toplam doz (CDD) hesaplanmıştır. Bütün deneyler üç kopya halinde yapıldı. Analiz için 4 farklı laktoz kullanılarak Tablo 3-5’te gösterilen örnekler hazırlandı.

Tablo 3-5: NGI analizinde kullanılan formülasyonlar

Formülasyon	Kullanılan laktoz	mp/laktoz	Kapsül
Sv-003	Respitose® sv003	1/5	HPMC
Ml-003	Respitose® ml003	1/5	HPMC
İl-230	InhaLac® 230	1/5	HPMC
Lh-200	Lactohale® 200	1/5	HPMC

mp: Vankomisin hidroklorür mikropartikülleri

3.4.9.2. DUSA analizi

DUSA testi, cihazdan yayılan ve dolayısıyla hasta için mevcut olan toplam ilaç miktarı olan teslim edilen dozun (CDD) miktarının belirlenmesine izin verir. CDD’in aynılığı, USP 36’da belirtildiği gibi 4 l hava geçişi sağlamak için 60 l/dakika akış hızında 4 saniye boyunca DUSA kullanılarak test edildi. Aerolizer® kullanarak 2 kapsül cihaza püskürtülür. Daha sonra püskürtülen doz yakaladıktan sonra, ilaç 10 ml DCM içinde çözülür ve 10 ml distille su eklenerek DCM çözeltiden uzaklaştırılır. Çözeltiden örnek olarak UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak analiz edilir. Tüm testler 3 kopya halinde yapıldı. DUSA analizi için hazırlanan örnekler Tablo 3-6’da özetlenmiştir.

Tablo 3-6: DUSA analizinde kullanılan formülasyonlar

Formülasyon	Kullanılan laktoz	mp/laktoz	Kapsül
Sv-003-a	Respitose® sv003	1:5	HPMC
Ml-003-a	Respitose® ml003	1:5	HPMC
İl-230-a	Inhalac®230	1:5	HPMC
Lh-200-a	Lactohale® 200	1:5	HPMC
Sv-003-b	Respitose® sv003	1:5	SJK
Ml-003-b	Respitose® ml003	1:5	SJK
İl-230-b	Inhalac®230	1:5	SJK
Lh-200-b	Lactohale® 200	1:5	SJK

mp: Vankomisin hidroklorür mikropartikülleri

4. BULGULAR

4.1. Vankomisin hidroklorürün Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ile İlgili Bulgular

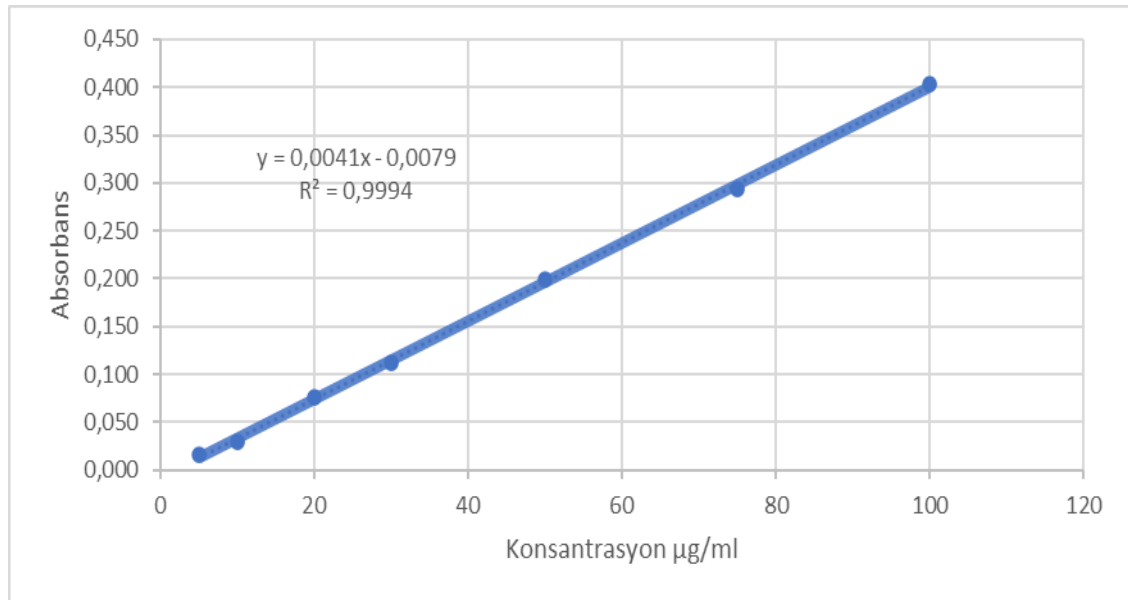
4.1.1. Vankomisin hidroklorürün UV-vis Spektrofotometrisi ile Analizi Bulguları

Vankomisin hidroklorürün sulu çözeltisinin, 200-700 nm aralığında UV-vis spektrometresi ile spektrumu alınmıştır. Vankomisin hidroklorürün maksimum absorbans verdiği dalga boyu ($\lambda_{\max}$) 280 nm olarak bulunmuştur.

4.1.2. Kalibrasyon Doğrularının Analitik Validasyonuna ait bulgular

4.1.2.1. Doğrusallık

Vankomisin hidroklorürün Bölüm 3.3.3.1’de açıklandığı şekilde yapılan çalışmasından elde edilmiş standart eğri grafiği Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Standart eğri parametrelerinin değerleri Tablo 4.1’de ve standart eğrinin hazırlanmasında kullanılan absorbans ortalamaları (ABS_{ORT}), relatif standart sapma (%RSD) ve standart sapma (SD) verileri Tablo 4.2’de verilmiştir



Şekil 4-1: Vankomisin hidroklorürün standart eğri grafiği

y: Absorbans; x: Konsantrasyon (mg/ml); r^2 : Determinasyon katsayısı

Tablo 4-1: Vankomisin hidroklorürün standart eğrisine ait parametreler

Eğim	Kesişim	r^2
0,0041	-0,0079	0,9994

r^2 -determinasyon katsayısı

Tablo 4-2: Vankomisin hidroklorürün miktar tayini yönteminin doğrusalığına dair veriler

Konsantrasyon (µg/ml)	ABS_{ORT}	SD (±)	%RSD (%)
5	0,0163	0,0006	3,53
10	0,0293	0,0006	1,97
20	0,0757	0,0006	0,76
30	0,1117	0,0015	1,37
50	0,1987	0,0015	0,77
75	0,2940	0,0010	0,34
100	0,4030	0,0010	0,25

ABS_{ORT} : Absorbans ortalamaları, %RSD: Relatif standart sapma, SD: Standart sapma

4.1.2.2. Doğruluk

Üç farklı konsantrasyonda hazırlanan Vankomisin hidroklorür çözeltisinin Bölüm 3.3.3.2’de açıklandığı şekilde okutulması yapılarak doğruluk çalışması gerçekleştirilmiştir. Her bir konsantrasyon örneği için geri kazanım yüzdesi (%), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4-3’te verilmiştir.

Tablo 4-3: Vankomisin hidroklorürün miktar tayini yönteminin doğruluk çalışması verileri (n=6)

Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama pratik konsantrasyon (µg/ml)	Geri kazanım değeri (%)	SD (±)	RSD (%)
20	21,07	105,33	0,37	1,77
50	50,83	101,66	0,63	1,24
100	100,22	100,22	0,22	0,22

%RSD: Relatif standart sapma, SD: Standart sapma

4.1.2.3. Kesinlik

Vankomisin hidroklorürün miktar tayini metodunun kesinliğinin belirlenmesinde tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametrelerine bakılmıştır. Tekrarlanabilirlik testi için Vankomisin hidroklorürün Bölüm 3.3.3.2’de açıklandığı şekilde UV okutulması alınmıştır. Ölçümlere ait ortalama pratik konsantrasyon, standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4-4’te verilmiştir.

Tablo 4-4: Vankomisin hidroklorürün miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirlik ölçümlerine dair veriler (n=6)

Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama pratik konsantrasyon (µg/ml)	SD (±)	%RSD (%)
20	20,9	0,38	1,82
50	51,4	0,65	1,2
100	102	0,22	0,22

%RSD: Relatif standart sapma, SD: Standart sapma

Ara kesinlik testi için ise art arda iki günde üç farklı konsantrasyonun altışar kez okuma yapılmıştır. Ortalama pratik konsantrasyon, standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4-5’te verilmiştir.

Tablo 4-5: Vankomisin hidroklorürün miktar tayini yönteminin ara kesinlik ölçümlerine dair veriler (n=6)

Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Ölçüm yapılan gün	Ortalama pratik konsantrasyon (µg/ml)	SD (±)	%RSD (%)
20	gün	20,9	0,38	1,82
	gün	21,7	0,144	0,66
50	gün	51,4	0,65	1,26
	gün	49,87	0,52	1,04
100	gün	102	0,22	0,22
	gün	100,7	0,144	0,14

%RSD: Relatif standart sapma, SD: Standart sapma

4.1.2.4. Seçicilik (Özgünlük)

Formülasyonlarda yer alan yardımcı maddelerin çözeltileri ve her bir boş mikropartikül formülasyonunun UV-vis spektrofotometrede 200-700 nm aralığında spektrumları alınmış ve Vankomisin hidroklorürün çözeltisinin maksimum absorbans gösterdiği 280 nm’de pik verip vermediğine bakılmıştır. Sonuç olarak kullanılan hiçbir maddenin ve boş mikropartikül formülasyonunun 280 nm’de pik vermediği Şekil 4-2’de görülmüştür.

Abcis.	ABS	Abcis.	ABS
633.0	0.261		
536.0	0.667		
451.0	0.947		
366.0	1.997		
340.0	2.064		

Şekil 4-2: Boş mikropartikül formülasyonunun UV-Vis Spektrofotometresi ile taranması

4.1.2.5. Teşhis sınırı (LOD)

Bölüm 3.3.3.5'te gösterildiği gibi hesaplama yapılarak aşağıdaki LOD değeri bulunmuştur.

$$\text{LOD} = 0,777 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

4.1.2.6. Tayin sınırı (LOQ)

Bölüm 3.3.3.6'te gösterildiği gibi hesaplama yapılarak aşağıdaki LOQ değeri bulunmuştur.

$$\text{LOQ} = 2,355 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

4.2. Önformülasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular

4.2.1. Etken Madde Yükleme Çalışmaları

PLGA mikropartiküllerine farklı miktarlarda Vankomisin HCl (VANKO) yükleyerek yapılan ön formülasyon çalışmaları Tablo 4-6'da verilmiştir.

Tablo 4-6: Farklı miktarlarda Vankomisin yükleyerek yapılan önformülasyon çalışmalarına ait veriler

Formülasyon	VANKO (mg)	PB (μm)	PDI	Enkapsülasyon etkinliği (%)	VANCO oranı (%)	Verim (%)
V-0	0	5,07 $\pm$ 0,15	0,097	-		79,18
V-5	5	5,58 $\pm$ 0,21	0,338	65,27 $\pm$ 1,27	3,10	76,55
V-10	10	5,68 $\pm$ 0,46	0,213	48,71 $\pm$ 0,86	4,42	77,45
V-15	15	4,81 $\pm$ 0,30	0,434	31,89 $\pm$ 0,58	4,15	78,18

VANKO: Vankomisin hidroklorür, PB: Partikül büyüklüğü, PDI: Partikül büyüklüğü dağılımı

4.2.2. Polimer Seçimine Ait Önformülasyon Çalışmaları

Polimer olarak kullanılan PLGA'nın farklı Rosomerleri kullanılarak yapılan ön formülasyon çalışmalarına ait partikül büyüklüğü, PDI, enkapsülasyon etkinliği ve ürün verimliliği bilgileri Tablo 4-7'de verilmiştir.

Tablo 4-7: Farklı PLGA Rosomerleri kullanılarak yapılan önformülasyon çalışmaları

Formülasyon	PB (μm)	PDI	Enkapsülasyon etkinliği (%)	Verim (%)
ÖF-1	5,57 $\pm$ 0,46	0,347	43,59 $\pm$ 0,92	82,64
ÖF-2	5,38 $\pm$ 0,37	0,383	41,31 $\pm$ 1,08	86,00
ÖF-3	3,31 $\pm$ 0,13	0,416	54,46 $\pm$ 1,26	84,00

PB: Partikül büyüklüğü, PDI: Partikül büyüklüğü dağılımı

4.3. Formülasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular

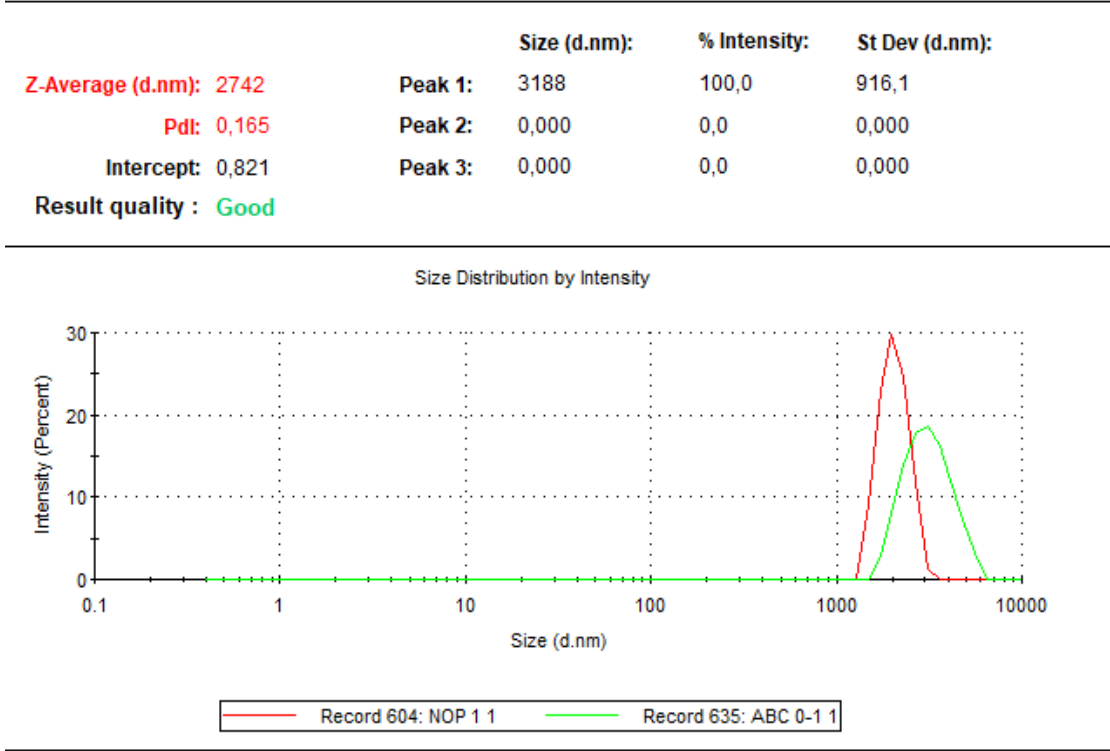
4.3.1. Partikül Büyüklüğünün Saptanması ile İlgili Bulgular

Bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi S/Y/S çözücü emülsiyon/buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan mikropartiküller Bölüm 3.5.1'de yazıldığı gibi analiz edilerek partikül büyüklükleri ve PDI değerleri tayin edilmiştir. Elde edilen değerler Tablo 4-8 de özetlenmiştir. Formülasyonların partikül büyüklüğüne ait grafikler Şekil 4-3, Şekil 4-4, Şekil 4-5 ve Şekil 4-6'da verilmiştir.

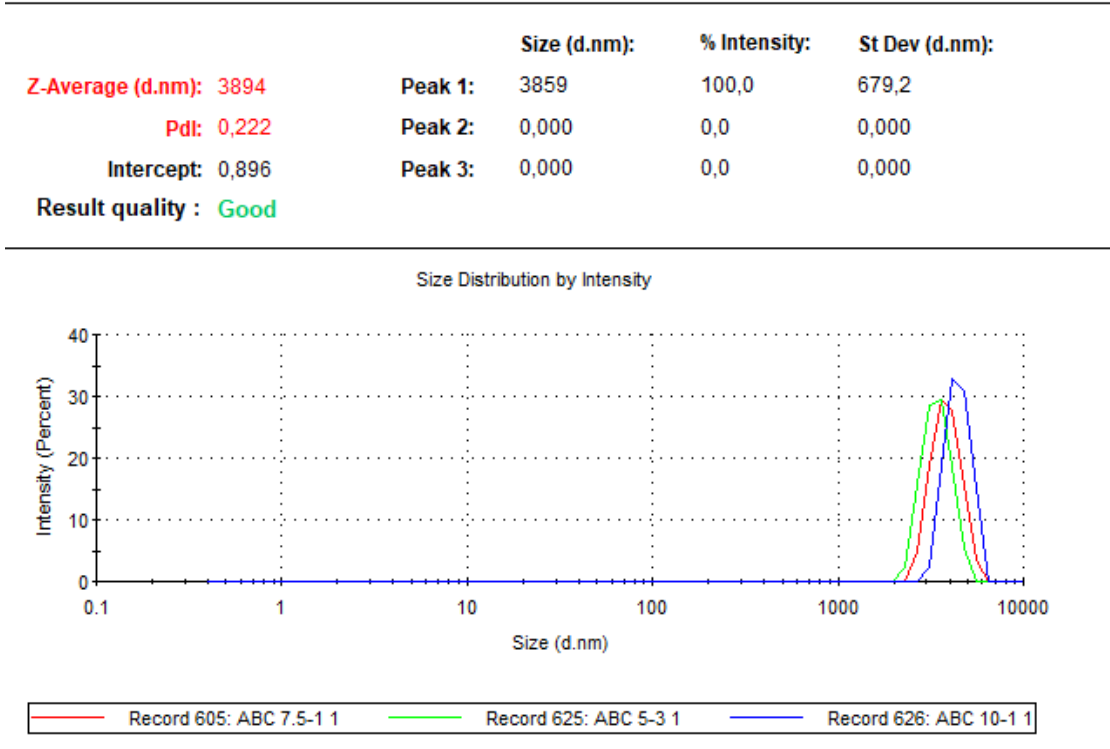
Tablo 4-8: Formülasyonlara ait partikül büyüklüğü ve PDI değerleri

Formülasyon	Partikül büyüklüğü (μm)	PDI
ABC-0	2,67 $\pm$ 0,09	0,228
NOP	3,08 $\pm$ 0,05	0,313
ABC-5	3,63 $\pm$ 0,32	0,159
ABC-7.5	4,03 $\pm$ 0,25	0,181
ABC-10	4,68 $\pm$ 0,17	0,33
SC-5	3,82 $\pm$ 0,05	0,272
SC-7.5	4,41 $\pm$ 0,44	0,298
SC-10	3,92 $\pm$ 0,24	0,288
SBC-5	5,50 $\pm$ 0,96	0,15
SBC-7.5	4,71 $\pm$ 0,47	0,191
SBC-10	4,61 $\pm$ 0,32	0,205

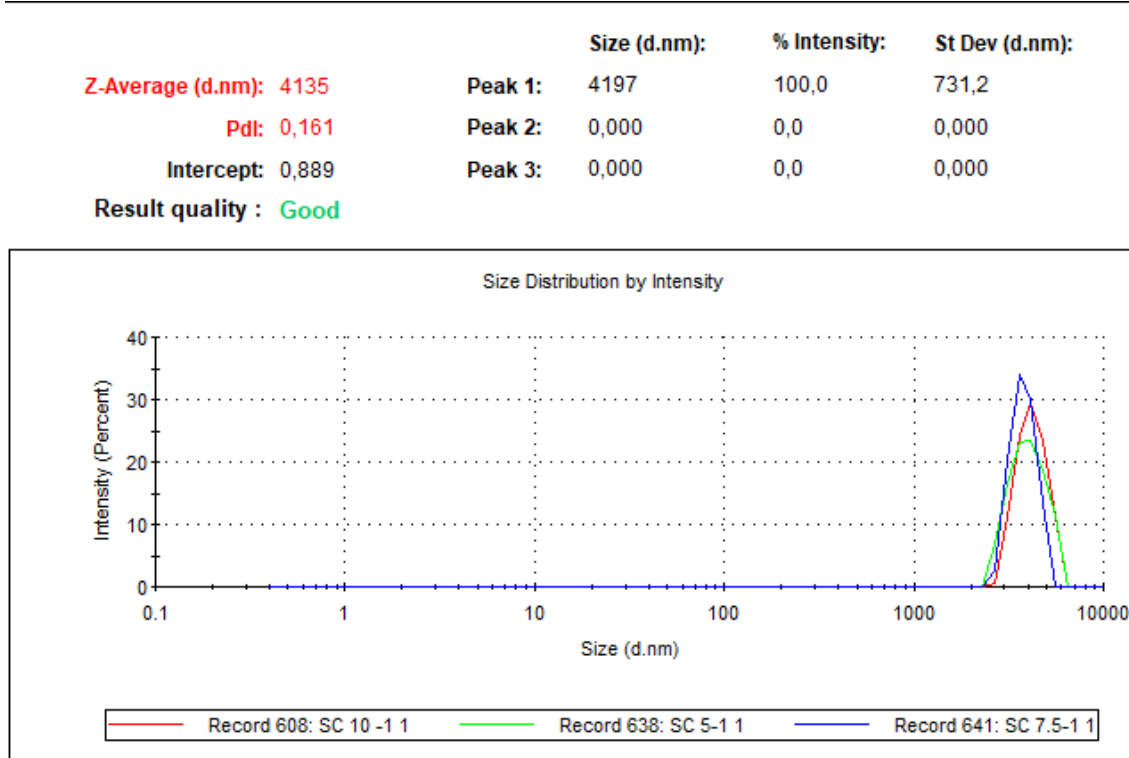
PDI: Partikül büyüklüğü dağılımı



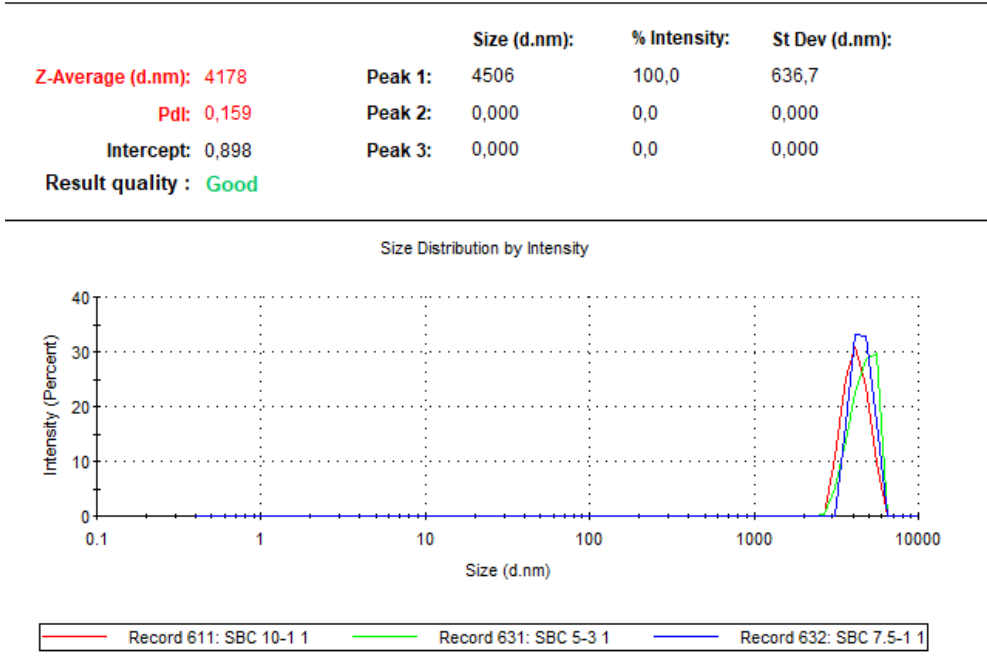
Şekil 4-3: NOP ve ABC-0 formülasyonuna ait Zetasizer görüntüleri



Şekil 4-4: ABC-5, ABC-7,5 ve ABC-10 formülasyonuna ait Zetasizer görüntüleri



Şekil 4-5: SC-5, SC-7,5 VE SC-10 formülasyonuna ait Zetasizer görüntüleri



Şekil 4-6: SBC-5, SBC7,5 ve SBC-10 formülasyonuna ait Zetasizer görüntüleri

4.3.2. Zeta potansiyel Ölçümlerine Ait Veriler

Hazırlanmış formülasyonların zeta potansiyel ölçümleri Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo 4-9’da özetlenmiştir.

Tablo 4-9: Zeta potansiyel ölçümlerine ait veriler

Formülasyon	Zeta potansiyel
ABC-0	-0,90±0,27
NOP	-1,15±0,09
ABC-5	-1,22±0,13
ABC-7.5	-1,86±0,03
ABC-10	-2,63±0,71
SC-5	-1,67±0,30
SC-7.5	-1,79±0,15
SC-10	-1,85±0,15
SBC-5	-1,66±0,01
SBC-7.5	-1,66±0,10
SBC-10	-1,66±0,40

4.3.3. Mikropartikül Formülasyonlarının Enkapsülasyon Etkinliğine Dair Veriler

Mikropartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri Bölüm 3.5.5.1’de anlatıldığı gibi İndirekt ve Bölüm 3.5.5.2’de anlatıldığı gibi direkt olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan enkapsülasyon değerleri Tablo 4-10’da verilmiştir.

Tablo 4-10: Enkapsülasyon etkinliğine ait veriler

Formulasyon	Enkapsulasyon (%)
NOP	22,21±0,47
ABC-5	75,79±0,35
ABC-7.5	64,88±0,87
ABC-10	55,48±0,94
SC-5	15,06±0,95
SC-7.5	11,08±0,6
SC-10	8,80±0,47
SBC-5	69,84±0,54
SBC-7.5	50,30±0,75
SBC-10	29,41±0,56

4.3.4. Ürün Verimliliğine Ait Bulgular

Hazırladığımız formülasyonların ürün verimliliğini Bölüm 3.5.6’da anlatıldığı gibi tayin edilmiştir. Hesaplanan verimlilik yüzdeleri tablo 4-11’de özetlenmiştir.

Tablo 4-11: Ürün Verimliliğine Ait Bulgular

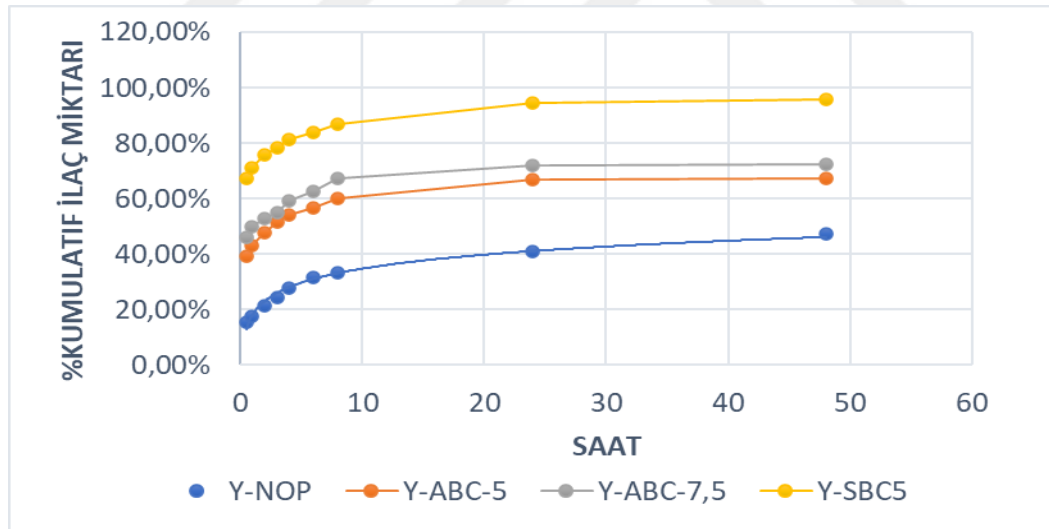
Formulasyon	Ürün Verimi (%)
BOŞ	79,25±1,36
NOP	81,54±1,23
ABC-5	80,64±0,64
ABC-7.5	84,32±2,38
ABC-10	83,18±1,16
SC-5	77,09±5,79
SC-7.5	77,86±1,86
SC-10	77,82±0,51
SBC-5	75,32±2,12
SBC-7.5	79,00±5,40
SBC-10	78,55±0,13

4.3.5. İn Vitro Çözünme Hızı Bulguları

İnvitro çözünme hızı testleri Bölüm 3.5.8’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Çözünme hızı verileri Tablo 4-12’de özetlenmiştir. Şekil 4-6’da seçilmiş formülasyonların çözünme hızı grafikleri gösterilmiştir.

Tablo 4-12: İn vitro çözünme hızı verileri

Formülasyon	NOP	ABC-5	ABC-7.5	SBC-5
Saat	(%)	(%)	(%)	(%)
0,5	15,32	39,22	46,21	67,10
1	17,50	43,14	49,87	71,12
2	21,50	47,62	52,76	75,79
3	24,50	51,36	54,94	78,16
4	27,70	54,11	59,28	81,45
6	31,68	56,76	62,62	83,85
8	33,11	60,04	67,41	87,00
24	40,90	66,89	71,82	94,40
48	47,17	67,48	72,41	95,92



Şekil 4-7: İn vitro salım çalışması yapılan formülasyonların çözünme hızı grafikleri

4.3.6. Dondurarak Kurutma ve Stabilizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Dondurarak kurutma ve stabilizasyon çalışmaları Bölüm 3.5.8’de anlatıldığı gibi yapılarak, partikül büyüklüğü-SİZE (Tablo 4-13), polidispersite indeksi-PDI (Tablo 4-14) ve Zeta Potansiyal-ZP (Tablo 4-15) ölçümlerinin sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Tablo 4-13: Liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları

Formülasyon	SİZE-LS (μm)	SİZE-2. Hafta (μm)	SİZE-1. Ay (μm)	SİZE-3. Ay (μm)
ABC-5	4,05 $\pm$,05	2,211 $\pm$ 0,7	2,654 $\pm$ 0,45	3,025 $\pm$ 0,35
AL1	3,13 $\pm$ 0,58	3,83 $\pm$ 0,45	4,25 $\pm$ 0,14	4,36 $\pm$ 0,36
AL3	4,12 $\pm$ 0,43	4,73 $\pm$ 0,52	4,86 $\pm$ 0,19	5,01 $\pm$ 0,28
AL5	4,94 $\pm$ 0,25	5,09 $\pm$ 0,17	5,04 $\pm$ 0,07	5,13 $\pm$ 0,14
AS1	4,07 $\pm$ 0,28	4,17 $\pm$ 0,21	4,12 $\pm$ 0,25	4,25 $\pm$ 0,20
AS3	2,67 $\pm$ 0,14	2,51 $\pm$ 0,12	2,74 $\pm$ 0,11	2,70 $\pm$ 0,08
AS5	2,56 $\pm$ 0,21	2,49 $\pm$ 0,16	2,63 $\pm$ 0,17	2,71 $\pm$ 0,16
AT1	4,12 $\pm$ 0,34	2,07 $\pm$ 0,25	3,78 $\pm$ 0,35	4,35 $\pm$ 1,21
AT3	2,74 $\pm$ 0,30	2,68 $\pm$ 0,15	2,78 $\pm$ 0,08	2,86 $\pm$ 0,19
AT5	2,84 $\pm$ 0,24	2,94 $\pm$ 0,18	3,01 $\pm$ 0,12	2,90 $\pm$ 0,21
SBC-5	5,41 $\pm$ 0,49	5,52 $\pm$ 0,43	6,21 $\pm$ 1,14	6,47 $\pm$ 1,09
SL1	3,05 $\pm$ 0,29	3,15 $\pm$ 0,23	3,29 $\pm$ 0,42	3,52 $\pm$ 0,56
SL3	2,75 $\pm$ 0,71	2,54 $\pm$ 0,83	2,68 $\pm$ 0,16	2,84 $\pm$ 0,14
SL5	2,54 $\pm$ 0,44	2,75 $\pm$ 0,30	2,65 $\pm$ 0,06	2,70 $\pm$ 0,12
SS1	2,70 $\pm$ 0,35	2,90 $\pm$ 0,41	2,81 $\pm$ 0,11	3,01 $\pm$ 0,15
SS3	4,56 $\pm$ 0,58	3,90 $\pm$ 0,25	4,67 $\pm$ 0,65	5,07 $\pm$ 1,09
SS5	2,84 $\pm$ 0,41	2,96 $\pm$ 0,26	3,12 $\pm$ 0,21	3,18 $\pm$ 0,16
ST1	2,86 $\pm$ 0,28	2,81 $\pm$ 0,50	2,93 $\pm$ 0,35	2,98 $\pm$ 0,24
ST3	2,70 $\pm$ 0,43	2,81 $\pm$ 0,32	2,75 $\pm$ 0,25	2,83 $\pm$ 0,15
ST5	2,76 $\pm$ 0,59	2,84 $\pm$ 0,76	2,88 $\pm$ 0,52	2,96 $\pm$ 0,35

SİZE-LS: Liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğü

Tablo 4-14: Liyofilizasyon sonrası polidispersite indeksi ölçüm sonuçları

Formülasyon	PDI-LS	PDI-2. Hafta	PDI-1. Ay	PDI-3. Ay
ABC-5	0,521	0,524	0,638	0,647
AL1	0,744	0,856	0,865	0,874
AL3	0,625	0,644	0,658	0,691
AL5	0,284	0,306	0,315	0,303
AS1	0,296	0,356	0,378	0,401
AS3	0,312	0,352	0,366	0,342
AS5	0,350	0,395	0,403	0,424
AT1	0,548	0,681	0,698	0,721
AT3	0,327	0,354	0,352	0,365
AT5	0,320	0,335	0,342	0,357
SBC-5	0,567	0,628	0,712	0,764
SL1	0,368	0,392	0,426	0,451
SL3	0,315	0,323	0,336	0,341
SL5	0,240	0,251	0,261	0,301
SS1	0,247	0,253	0,266	0,271
SS3	0,274	0,289	0,285	0,293
SS5	0,284	0,292	0,301	0,317
ST1	0,325	0,318	0,339	0,328
ST3	0,451	0,424	0,489	0,475
ST5	0,329	0,346	0,352	0,361

PDI-LS: Liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğü dağılımı

Tablo 4-15: Liyofilizasyon sonrası Zeta potansiyel ölçüm sonuçları

Formülasyon	ZP-LS	ZP-2. Hafta	ZP-1. Ay	ZP-3. Ay
ABC-5	-0,79±0,1	-0,74	-0,82±0,1	-0,86±0,1
AL1	-7,98±0,4	-8,85±0,3	-8,56±0,3	-8,95±0,3
AL3	-10,7±0,4	-11,3±0,2	-11,1±0,2	-11,9±0,4
AL5	-12,6±0,3	-13,1±0,3	-12,8±0,1	-12,3±0,2
AS1	-11,8±0,2	-12,5±0,2	-12,6±0,3	-13,1±0,2
AS3	-16,4±0,4	-16,9±0,6	-15,8±0,5	-15,6±0,4
AS5	-16,1±0,5	-16,8±0,7	-17,3±0,3	-17,7±0,5
AT1	-19,7±0,4	-15,7±0,2	-12,3±0,8	-14,3±1,1
AT3	-12,9±0,2	-14,8±0,3	-13,6±0,4	-13,3±0,3
AT5	-19,4±0,3	-20,4±0,2	-20,1±0,6	-19,6±0,7
SBC-5	-1,1±0,08	-1,2±0,1	-1,18±0,1	-2,13±0,4
SL1	-16,7±0,3	-17,5±0,2	-15,5±0,6	-16,4±0,8
SL3	-22,1±0,7	-21,4±0,6	-20,9±0,2	-20,4±0,4
SL5	-16,2±0,4	-17,7±0,3	-16,8±0,4	-16,3±0,3
SS1	-22,6±0,4	-23,4±0,2	-18,5±0,2	-19,4±0,4
SS3	-21,5±0,3	-16,3±0,4	-15,1±0,3	-17,3±0,2
SS5	-22,6±0,2	-24,2±0,1	-23,7±0,1	-24,5±0,2
ST1	-14,7±0,3	-13,4±0,4	-13,7±0,3	-14,1±0,2
ST3	-15,2±0,3	-14,5±0,4	-15,8±0,5	-16,2±0,4
ST5	-25,9±0,4	-28,7±0,3	-24,4±0,4	-26,3±0,2

ZP-LS: Liyofilizasyon sonrası zeta potansiyel

4.3.7. İn Vitro Performans Testlerine Ait Bulgular

NGI ve DUSA analizleri için hazırlanan kuru toz formülasyonları kapsüllere doldurularak (Şekil 4-8) analize kadar desikatörde tutulmuştur.



Şekil 4-8: Analiz için kapsüllere doldurulmuş formülasyonlar

4.3.7.1. NGI Analizine Ait Bulgular

Bölüm 3.5.8.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan formülasyonların NGI analizi yapılmıştır. NGI cihazının farklı bölmelerinin ölçüleri ve bu bölmelerde toplanan mikropartikül miktarları Tablo 4-13’de verilmiştir. Şekil 4-7’de SV-003 mikropartikül formülasyonunun NGI analizi sırasında mikropartiküllerin, cihazın bölmelerinde birikmesi gösterilmiştir. Analiz edilen Formülasyonlara ait tüm sonuçlar grafik haline getirilerek Şekil 4-8’de özetlenmiştir.

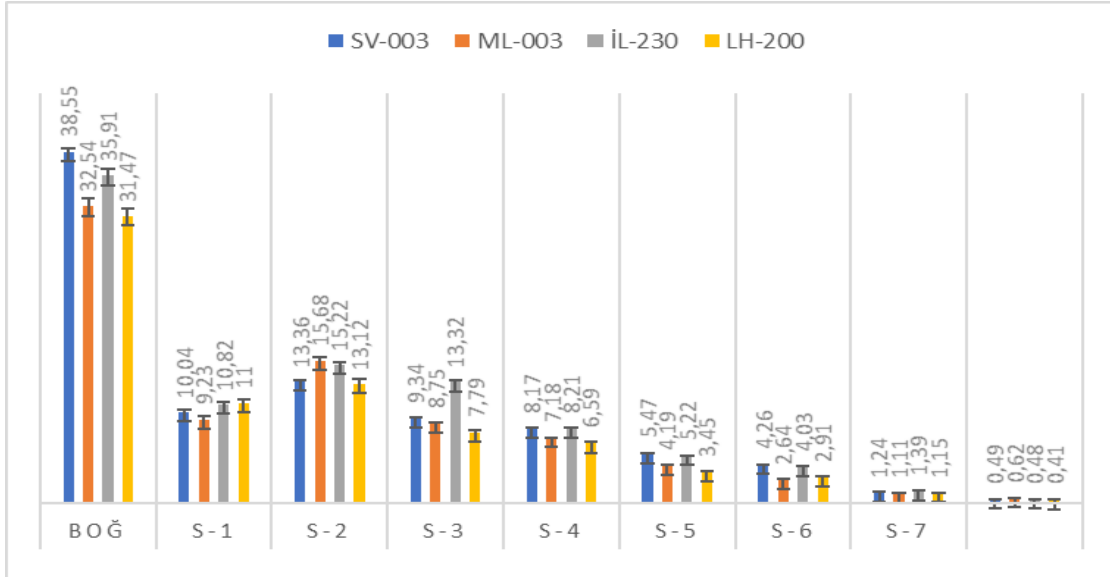
Tablo 4-16: NGI cihazının bölmelerinde biriken mikropartikül miktarı

NGI bölmesi	BPB (µm)	SV-003 (%)	ML-003 (%)	İL-230 (%)	LH-200 (%)
BOĞ	-	38,55	32,54	35,91	31,47
S-1	8,06	10,04	9,23	10,82	11
S-2	4,46	13,36	15,68	15,22	13,12
S-3	2,82	9,34	8,75	13,32	7,79
S-4	1,66	8,17	7,18	8,21	6,59
S-5	0,94	5,47	4,19	5,22	3,45
S-6	0,55	4,26	2,64	4,03	2,91
S-7	0,34	1,24	1,11	1,39	1,15
MOC	-	0,49	0,62	0,48	0,41

BPB: NGI cihazının bölmelerinde biriken minimum partikül boyutu



Şekil 4-9: SV-003 formülasyonunun NGI cihazının bölmelerinde birikmesi



Şekil 4-10: NGI analizinin sonuçlarının histogramları

NGI analizinin sonuçlarına göre Medyan kütle aerodinamik çapı (MMAD), Geometrik standart sapma (GSD), İnce partikül fraksiyonu (FPM) ve cihazdan salınan toplam doz (CDD) hesaplanarak Tablo 4-14’te özetlenmiştir.

Tablo 4-17: NGI analiz sonuçlarına göre yapılan mikropartiküllerin aerodinamik değerlendirilmesi

Formülasyon	MMAD (μm)	GSD	FPM (%)	CDD (%)
SV-003	3,93	2,75	41,84	90,92
ML-003	4,49	1,93	39,55	81,94
İL-230	4,02	2,18	47,39	94,62
LH-200	4,66	2,16	35,01	77,89

MMAD: Medyan kütle aerodinamik çapı, GSD: Geometrik standart sapma, FPM: İnce partikül fraksiyonu, CDD: Cihazdan salınan toplam doz

4.3.7.2. DUSA Analizine Ait Bulgular

DUSA analizi, Bölüm 3.5.8.2’de anlatıldığı gibi yapılarak Şekil 4-9’da gösterilen sonuçlar elde edilmiştir.

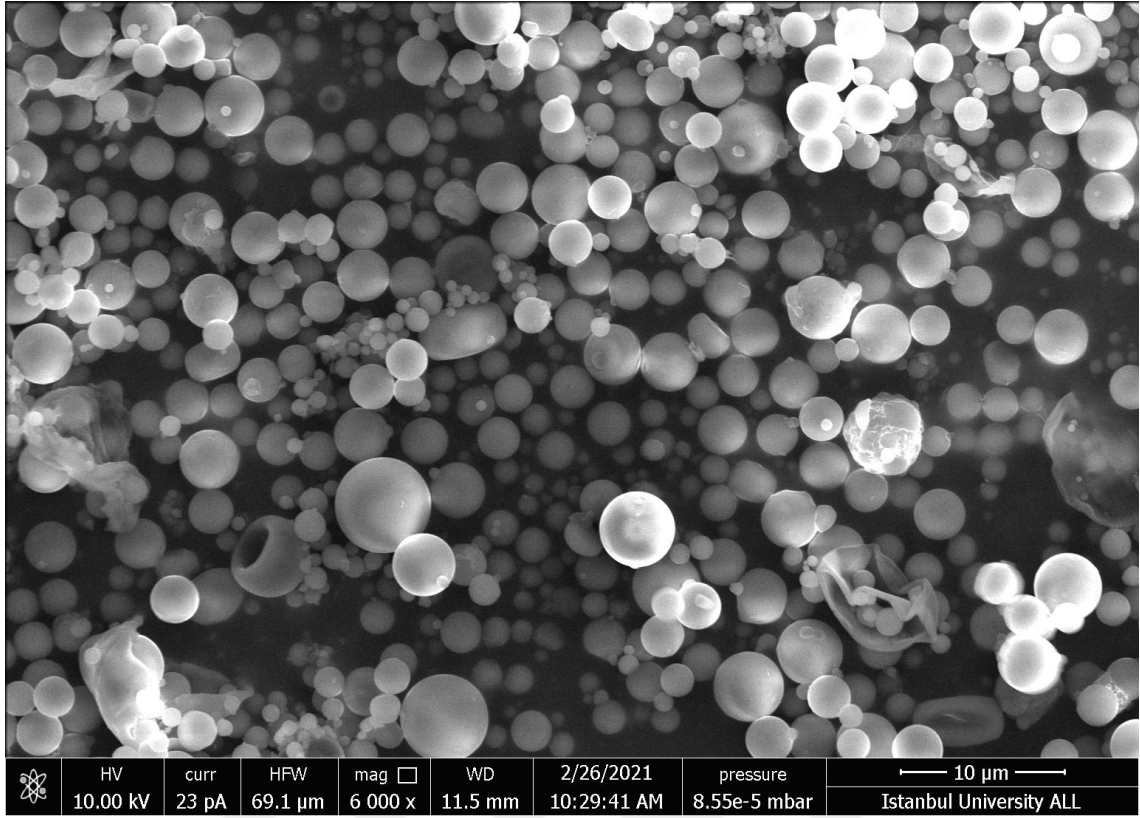


Şekil 4-11: DUSA analizi sonuçları

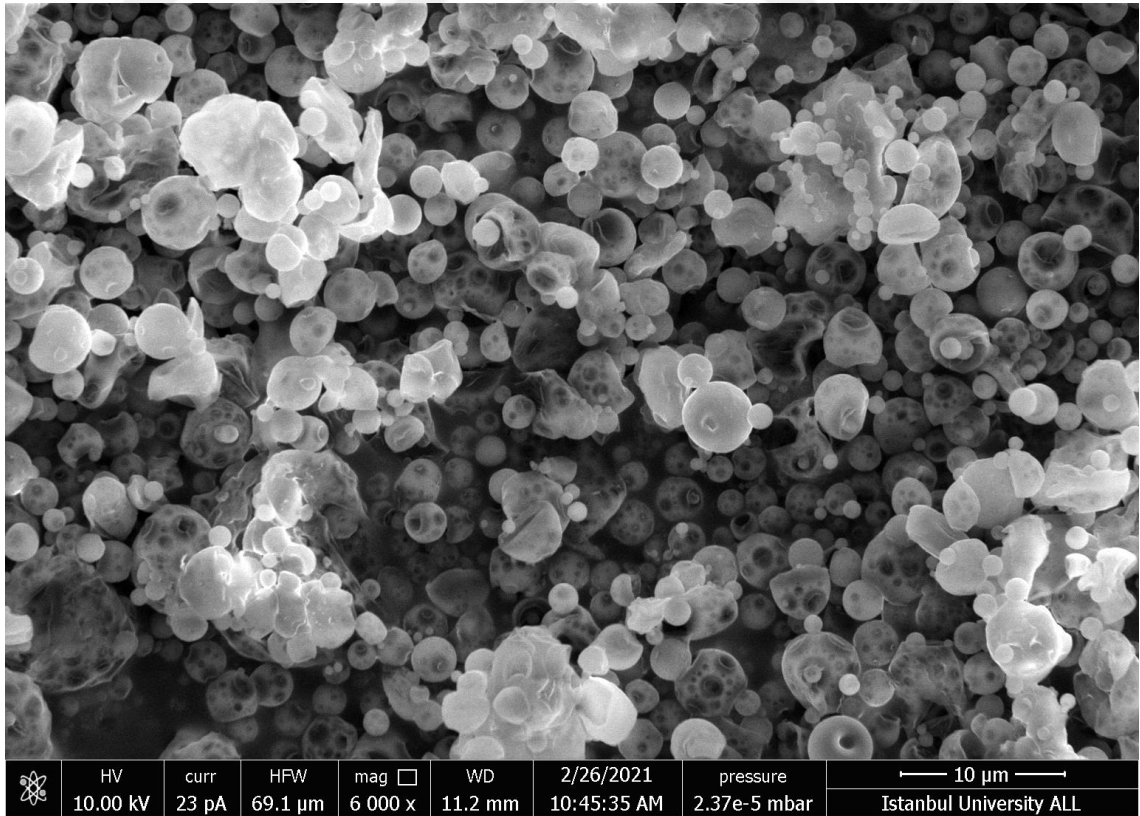
HPMC: Hidroksipropil-Metilselüloz, SJK: Sert Jelatin Kapsül

4.3.8. Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular

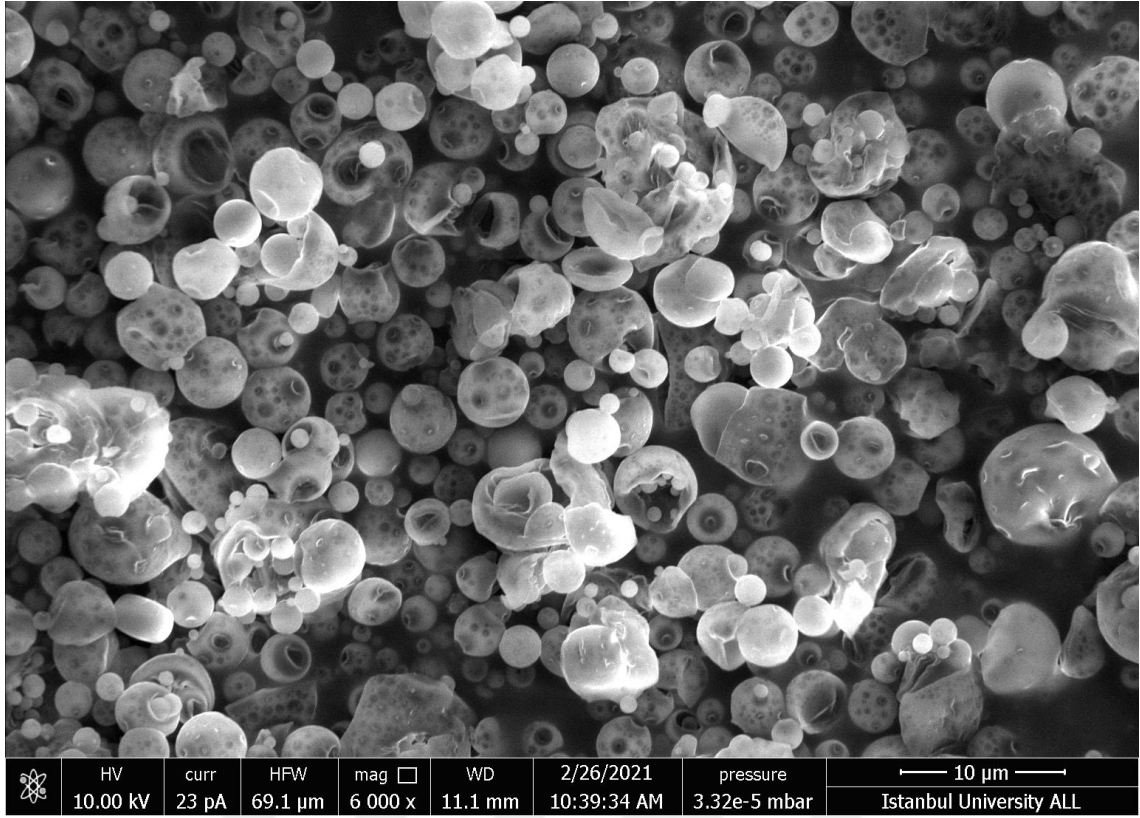
Mikropartiküllerin morfolojik özellikleri Bölüm 3.5.3’te anlatıldığı gibi elektron mikroskop yardımıyla yapılmıştır. İnceleme sonuçları Şekil 4-10’da verilmiştir.



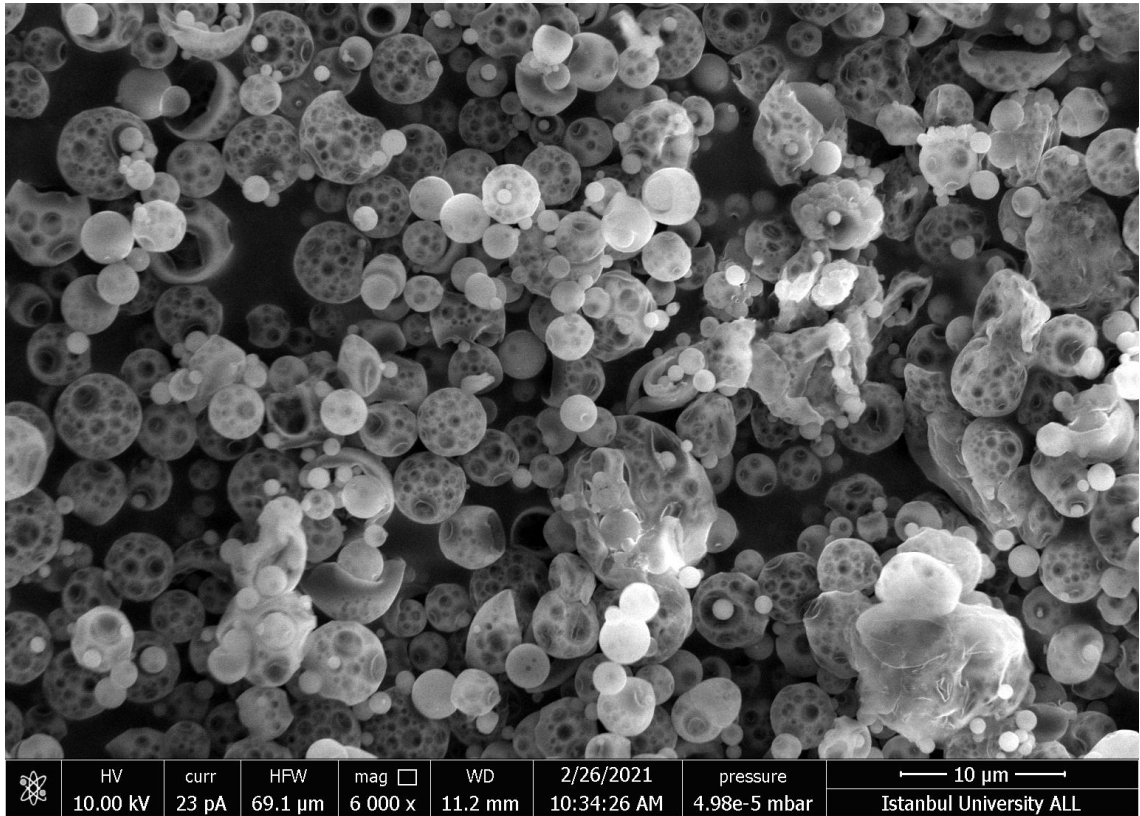
Şekil 4-12: NOP formülasyonunun SEM görüntüsü



Şekil 4-13: ABC-5: formülasyonunun SEM görüntüsü



Şekil 4-14: ABC-7,5 formülasyonunun SEM görüntüsü



Şekil 4-15: SC-5 formülasyonunun SEM görüntüsü

5. TARTIŞMA

Tezimizin bu bölümünde, sırasıyla Vankomisin hidroklorürün kalibrasyon doğrularının hazırlanması, bu kalibrasyon doğrularının analitik validasyonu, farklı PLGA mikropartiküllerine farklı miktarlarda Vankomisin hidroklorür yükleme gibi ön formülasyon çalışmaları, partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyeli gibi formülasyonların morfoloji özelliklerine ait çalışmalar, bu mikropartiküller üzerinde enkapsülasyon ve üretim verimine ait çalışmalar, farklı porözite oluşturuvcu ajanlarla yapılan formülasyon optimizasyon çalışmaları, hazırlanan formülasyonlar üzerinde partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyeli gibi formülasyonların morfoloji özelliklerine ait çalışmalar, bu mikropartiküller üzerinde enkapsülasyon ve üretim verimine ait çalışmalar, daha sonraki aşamalar için uygun özellikle sahip formülasyonlar üzerinde *in vitro* salım çalışmaları, Poröz mikropartikül formülasyonlarının SEM ile morfolojilerinin incelenme çalışmaları, liyofilizasyon ve stabilite çalışmaları, kuru toz mikropartiküllerinin akciğerlerdeki dağılımını belirlemek açısından NGI ve DUSA analizi çalışmaları ele alınarak tartışılmıştır.

Vankomisin hidroklorürün miktar tayinini yönteminin validasyonunda distille su ortamı kullanılmıştır. Distille su ortamının seçilmesinin ana nedeni vankomisin hidroklorürün suda çözünürlüğünün yüksek olmasıdır. Deneyler vankomisin hidroklorürün maksimum absorbands verdiği dalga boyu (λ_{max}) dikkate alınarak yapılmıştır. Vankomisin hidroklorürün distille su ortamı için 280 nm dalga boyunda maksimum absorbands gösterdiği belirlenmiştir.

Vankomisin hidroklorürün miktar tayini için yapılan çalışmalarda, yukarıda belirtilen dalga boyu kullanılmıştır. Vankomisin hidroklorürün bilinen konsantrasyon değerlerinin karşılığı olan absorbands değerleri tespit edildikten sonra, bu veriler kullanılarak miktar tayini kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Çizilen kalibrasyon eğrisinin r^2 değerinin 1'e çok yakın olması, standart hata değerlerinin düşük olması ve okutulan absorbands değerlerine göre hesaplanan konsantrasyonların güvenilir olduğunu göstermektedir.

Vankomisin hidroklorürün miktar tayini için yapılan analitik yöntem validasyonunda; doğrusallık, doğruluk, kesinlik, özgünlük, teşhis sınırı ve tayin sınırının belirlenmesine dair çalışmalar yapılmıştır.

Yapılan doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen değerler grafik haline getirildikten sonra çizilen doğruya ait r^2 değeri 1'e yakın ve regresyondan sapmanın standart sapmasının düşük oluşu çizilen doğrunun güvenilirliğine işaret etmektedir.

Miktar tayininin doğruluğunun belirlenmesinde kullanılan deneyler neticesinde elde edilen verilerde % bağıl standart sapma (%RSD) değerlerinin %2'den küçük olduğu görülmüştür. Bu deneyler miktar tayini için belirtilen yöntemin doğru sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Kullanılan yöntemin kesinliğini kanıtlamak amacıyla tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik testleri yapılmıştır. Elde edilen verilerin, % bağıl standart sapmalarının %2' den küçük olduğu belirtilerek çalışmanın tekrarlanabilirliği ve ara kesinliği kanıtlanmıştır.

Miktar tayini için seçilen yönteminin Vankomisin hidroklorüre özgü olup olmadığının kanıtlanması için, formülasyonun içinde bulunan her bir yardımcı maddenin formülasyondaki konsantrasyonlarında ve Vankomisin hidroklorür içermeyecek şekilde çözeltileri hazırlanmıştır. Ayrıca çalışmada yer alan mikropartiküller de Vankomisin hidroklorür içermeyen hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti ve boş mikropartikül formülasyonlarının UV-Vis spektrofotometresi kullanarak 200-700 nm dalga aralığında absorbans değerlerine bakılmıştır. Çözelti ve boş mikropartikül formülasyonlarının hiçbirisi Vankomisin hidroklorürün maksimum absorbans gösterdiği 280 nm dalga boyunda pik vermediği gösterilmiştir (Şekil 4-2). Bu da kullanılan miktar tayini yönteminin Vankomisin hidroklorüre özgü olduğunu göstermektedir.

Kullanılan miktar tayini yöntemine göre, Vankomisin hidroklorüre ait LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,777 $\mu\text{g/mL}$ ve 2,355 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

PLGA, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve biyoyumluluğundan dolayı güvenli kabul edilir, birçok PLGA bazlı nano ve mikro partiküller FDA tarafından onaylanmıştır. Bununla birlikte, enjeksiyon bölgelerinde inflamasyon veya nekroza yol açtığı bildirilmiştir (Anderson ve ark., 2012). Bu nedenle, inhale PLGA'nın uzun dönemli klinik uygulamasına daha dikkatli yaklaşılmalıdır çünkü inhale partikül

birikiminin marjinal süresi tartışmalıdır (Kim ve ark., 2011), (Anderson ve ark., 2012). Bununla birlikte, uygulama sisteminin akciğerlere seçici hedefleme açısından iyi klinik potansiyele sahip olduğuna inanıyoruz.

Hidrofilik bir antibiyotik olan vankomisin hidroklorürün PLGA mikropartiküllerine yüklenmesi, yüksek hidrofilikliği nedeniyle sorunlu olabilir. Hidrofilik molekülleri kapsülleme için en çok kullanılan teknik, çift (S/Y/S) emülsifikasyon yöntemi, ardından solvent ekstraksiyon / buharlaştırmadır (Hachicha ve ark., 2007).

Organik faz (Y), iki sulu bölme arasında bir bariyer görevi görür. Diklorometanın formülasyondan uzaklaşmasını hızlandırmak için bir manyetik karıştırıcı kullandık. Böylece ilacın dış faza (S2) geçişi engellenmiştir. Parçacık oluşumunun kendisi koaservasyona dayanır. Genel olarak, çözücü uzaklaştırma oranı, ilacın kapsülleme etkinliğini doğrudan etkiler (Yang ve ark., 2001), (Capan ve ark., 2003). Yavaş membran oluşum hızı, ilaç moleküllerinin PLGA membranının mükemmel sertleşmesinden önce PLGA membranının su kanalları yoluyla iç S1 fazından dış S2 su fazına yayılma şansını artırmanın bir sonucu olarak kapsülleme verimliliğini azaltabilir (Yang ve ark., 2001), (Thote ve ark., 2005). Bu nedenle hızlı membran oluşumu, vankomisin hidroklorürün dış S2 su fazına sızmasını engelleyen önemli bir kriterdir. Genel olarak, PVA, S/Y/S emülsiyon yönteminde bir dağıtıcı ajan olarak kullanılır. PLGA yüzeyi ile S2 su fazı arasındaki yüzey gerilimini düşürür (Yang ve ark., 2001). Bununla birlikte, PVA PLGA'nın yüzeyinde kalmasını engellemek için en az 3 kere yıkanarak santrifüjlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliğinin düşük olması, vankomisin hidroklorürün suda çözünür doğasına atfedilebilir. Artan teorik vankomisin hidroklorürün yüklemeleri ile azalan enkapsülasyon yüzdesi, yüksek yüklemelerde sulu faza artan ilaç sızıntısından kaynaklanmaktadır. Tüm formülasyonlar negatif zeta potansiyeli göstermiştir (Tablo 4-9), bu da itici kuvvetler yaşlanmayla kümeleşmeyi engellediğinden partikül stabilitesini arttırdığı düşünülmektedir (Agnihotri ve ark., 2009). PLGA mikropartiküllerinin negatif yükünün, yüzey polimerinin karboksilik gruplarının iyonlaşmasına bağlı olduğu bildirilmiştir (Zakeri-Milani ve ark., 2013).

PLGA mikropartiküllerine vankomisin hidroklorür yüklemesi için yapılan çalışmada yüklenen vankomisin miktarı arttıkça partikül büyüklüğünde bir artış gözlemlenmektedir. Bu formülasyonların enkapsülasyon etkinliklerine bakıldığında

yüklenen vankomisin hidroklorür miktarı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinde bir düşme olduğu görülmüştür (Tablo 4-6). Fakat V-15 formülasyonunda V-10 formülasyonu ile karşılaştırıldığında teorik olarak yüklenen vankomisin hidroklorür miktarı artmasına rağmen pratik yüklenmede aynı oranda bir artım gözlemlenmediğinden etken madde kaybına yol açmış ve bu yüzden ürün verimi daha düşük olmuştur. Mikropartikül boyutundaki artış ile vankomisin hidroklorürün teorik ilaç yükündeki artış muhtemelen PLGA mikropartiküllerinin yüzey yükünü etkilemiş olabilir. Bu da partiküllerin sıvı süspansiyon formunda depolanmaması gerektiğini ve bunun yerine liyofilize halde depolanmaları gerektiğini göstermektedir (Mukherjee ve ark., 2008; Zakeri-Milani ve ark., 2013).

Polimer olarak PLGA'nın farklı Resomerlerini kullanarak polimerin molekül ağırlığının hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve etken madde kapsülleme üzerindeki etkilerini inceledik. PLGA polimerinin moleküler ağırlığının artmasıyla birlikte yarılanma ömründe de bir artış olduğu bilinmektedir (Anderson ve ark., 2012). Bu bağlamda kullanılan Resomerlerde aranan özellikler, yüksek etken madde kapsülleyebilmesi ve düşük moleküler ağırlıkta olmasıdır ki bu da akciğerlerde polimer birikmesinin önüne geçebilmemize yardımcı olmaktadır. Dolayısıyla kullanılan PLGA Resomerlerinden RG 503h molekül ağırlığının çok fazla olmaması, RG 502h ile kıyaslandığında daha fazla vankomisin hidroklorür kapsülleyebilmesi ve hazırlanan mikropartikül boyutu ve boyut dağılımının istenen seviyede (1-5 µm arasında partikül büyüklüğü ve 0,3 altında bir PDI değeri) olması göz önünde bulundurularak formülasyon optimizasyon çalışmaları için seçilmiştir.

Büyük gözenekli polimerik mikropartiküller, inhalasyon yoluyla uzun süreli tedavi için optimum dağıtım sistemleri sağlar. Bu tür parçacıkların iki avantajı vardır: yüksek aerosolizasyon etkinliği ve makrofaj baypas (Edwards ve ark., 1997), (Edwards ve ark., 1998). Mikropartikül gözenekliliklerinin aerosolizasyon için yeterince aerodinamik yoğunlukları azalttığı iyi bilinmektedir (Edwards ve ark., 1998). Daha spesifik olarak, 1-5 µm MMAD'ye sahip gözenekli mikropartiküllerin iyi aerosol haline geldiği ve akciğerlere derinlemesine nüfuz ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, derin akciğerlerde küçük inhale mikropartikülleri (1-2 µm) hızla fagositoz yapabilen altı milyar alveolar makrofaj bulunduğu tahmin edilmektedir.

Gözenekli mikropartiküller yapmak için kullanılan yöntemler gibi birçok yöntem geliştirilmiştir; ekstrakte edilebilir porojenler (örneğin, pluronics) (Kim ve ark., 2006), ozmojenler (örneğin, siklodekstrinler) (Kvon ve ark., 2007), (Kim ve ark., 2011), efervesan tuzlar (amonyum bikarbonat) (Edwards ve ark., 1997) ve gaz kabarcıkları (hidrojen peroksit + katalaz) (Bae ve ark., 2009). Ekstrakte edilebilir porojenler ve ozmojenler, yüzey gözenekleri oluşturmak için PLGA matrislerinde birçok su kanalı üretir ve bu nedenle, önemli miktarlarda etken madde bu matrislerden sızabilir ve kapsülleme verimini azaltabilir. Öte yandan, amonyum bikarbonat gibi karbondioksit üreten gözenek oluşturuca ajanlar etken maddenin sızmasını hızlandırdığı görülmektedir (Kim ve ark., 2012). Böylece, yüksek mikropartikül yüzey gözeneklerine rağmen $75,79 \pm 0,9$ vankomisin hidroklorür kapsülleme etkinliği elde edilebilmiştir. Bununla birlikte, bu tür bir gözeneklilik, Vankomisin hidroklorürün PLGA mikropartiküllerinden önemli ilk patlama salınımı gösterdiği görülmüştür.

Gözenekli PLGA mikropartiküllerinin üretiminde porojen olarak amonyum bikarbonat, sodyum karbonat ve sodyum bikarbonat kullanılmıştır. Polimer faza bir iç sulu faz olarak porojen eklenmesi, istenen aerodinamik özelliklere sahip olan ve makrofaj alımını önleyebilen oldukça gözenekli büyük PLGA mikropartikülleri yaratmanın basit ve etkili bir yoluydu. Ek olarak, bu porojenlerin kullanımı, enkapsülasyon etkinliği büyük ölçüde arttırmıştır (Tablo 4-10). Düşük kapsülleme verimliliği, gözeneksiz mikropartiküllere ilaçların yüklenmesindeki ana zorluklardan biriydi. Bu özellik, porojenleri, geleneksel emülsiyon yöntemi kullanılarak polimerik matris içinde kapsüllenmesi zor olan hidrofilik ilaçların kapsüllenmesi için özellikle yararlı kılar. Örneğin, doksorubisin HCl'nin PLGA matrisinde kapsüllenmesi herkesin bildiği gibi zordur. Tewes ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ortalama 5 µm büyüklüğündeki poröz olmayan mikropartiküllere polimer ağırlığının sadece %0,7'si kadar etken madde yükleyebilirken formülasyonlarda gözenek oluşturmak için ABC kullanımı kapsüllenen etken madde miktarının PLGA miktarının %9'una kadar arttırmıştır (Tewes ve ark., 2007). Enkapsülasyondan önce bir ilacın serbest bazlı formunu yapmak, kapsülleme verimliliğini artırmak için yaygın bir tekniktir (Tewes ve ark., 2007), (Kohone ve ark 2002). Porojen tuzların bozunma ürünlerinin efervesansı, diklorometanın buharlaşmasını ve polimerin katılaşmasını artırarak ilaç kapsüllemesini daha da geliştirir. Bu nedenle porojenlerin kullanımı, soluma yoluyla ilaç verme ile sınırlı olmayan çeşitli uygulamalar için hidrofilik ilaçların kapsüllenmesi için yararlı bir

teknik olabilir (Yang ve ark., 2009). Çalışmamızın bu aşamasında Tablo 3-3'te gösterilen formülasyonları hazırladık. ABC, SBC ve SC porojenlerinin farklı oranlarda kullanılmasıyla hazırladığımız formülasyonlar üzerinde partikül büyüklüğü (Tablo 4-8), partikül büyüklüğü dağılımı (Tablo 4-8), zeta potansiyel (Tablo 4-9), enkapsülasyon etkinliği (Tablo 4-10) ve ürün verimliliğine (Tablo 4-11) dair testler yaptık. Tablo 4-8'de görüldüğü gibi hazırlanan formülasyonların partikül büyüklükleri boş ABC-0 formülasyonu için 2,67 µm iken, aynı formülasyona vankomisin hidroklorür yüklendiği zaman partikül büyüklüğü 3,08 µm olmuştur. Formülasyonlarda porojenler kullanıldığı zaman partikül büyüklükleri 3,63 -5,50 µm arasında değişmiştir. Aynı zamanda formülasyonda kullanılan porojen miktarı arttıkça partiküllerin büyüklüğünün de arttığı gözlemlenmiştir. Fakat fazla miktarda kullanılan porojen miktarı oldukça büyük gözenekler bıraktığından enkapsülasyon etkinliğini düşürdüğü görülmüştür. S/Y/S tipli çözücü emülsiyon buharlaştırma yöntemiyle hazırladığımız bu formülasyonlarda yüksek imalat verimi (%75-84) elde edilmiştir (Tablo 4-11).

Hazırlamış olduğumuz formülasyonlardan *in vitro* salım çalışmasında kullanmak üzere 4 formülasyon seçilmiştir. Bu formülasyonlardan ilki gözenekli olan formülasyonları karşılaştırmak açısından gözenekli olmayan NOP formülasyonu, diğer 3 formülasyon ise uygun partikül büyüklüğü, düşük partikül büyüklüğü dağılımı ve yüksek enkapsülasyon etkinliği göz önüne alınarak ABC-5, ABC-7,5 SBC-7,5 formülasyonlardır. Seçilen formülasyonlara Bölüm 3.5.8'de anlatıldığı gibi *in vitro* salım çalışması yapılmış ve Tablo 4-12'deki veriler elde edilmiştir. Mikropartiküllerde vankomisin hidroklorürün *in vitro* salım grafikleri Şekil 4-7'de gösterilmiştir. Poröz mikropartiküllerde vankomisin hidroklorür miktarının çoğu ilk 24 saatte salındığı gözlemlenirken (Tablo 4-12), poröz olmayan mikropartiküllerde 48 saatte kapsüllenene vankomisin hidroklorür miktarının sadece %47,17'si mikropartiküllerden salınmıştır. Bunun başlıca nedeni olarak vankomisin hidroklorürün gözeneklerden kolayca salınabilmesi düşünülmektedir. Salım çalışmasında özellikle üç aşama gözlemlenmiştir. İlk yarım saat boyunca hızlı bir salım adımı gözlemlendi (kapsüllenmiş vankomisin hidroklorürün NOP, ABC-5, ABC-7,5 ve SBC-5 formülasyonları için sırasıyla %15,32, %39,22, %46,21 ve %67,10'ünün salımı). "Patlama etkisi" olarak bilinen bu salım, dış partikül yüzeyine adsorbe edilen ve matrise dahil edilen hemen elde edilebilen ilaç fraksiyonundan kaynaklanmıştır (Hachicha ve ark., 2007). Daha sonra daha yavaş bir adım oluştu ve 24 saatin sonundaki ölçümlerde kapsüllenmiş vankomisin hidroklorürün

NOP, ABC-5, ABC-7,5 ve SBC-5 formülasyonları için sırasıyla %40,90, %66,89, %71,82 ve %94,40'ı salım ortamına geçmiştir. Çalışmanın sonraki 24 saatinde vankomisin hidroklorürün poröz formülasyonlar için sadece %1'e yakını poröz olmayan formülasyon içinse %6,73'ünün serbest bırakıldığı tespit edilmiştir. Vankomisin hidroklorürün hızlı ilk salımı, muhtemelen mikropartiküllerin yüzeyinde veya yakınında adsorbe edilen ilaca ve boyutlarından dolayı mikropartikül geometrisinin geniş yüzey oranına bağlı olduğu düşünülmektedir (Govender ve ark., 1999). Paklitaksel ve enalapril PLGA mikropartikülleri üzerinde çalışan diğer araştırmacılar tarafından da benzer bulgular bildirilmiştir (Fonseca ve ark., 2002; Ahlin ve ark., 2002).

Mikropartiküllerin partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımı dondurarak kurutma sırasında izlenecek önemli bir parametredir. Partikül boyutları, mikropartiküllerin stabilitesi ile doğrudan ilişkilidir. Dondurarak kurutma hem dondurma hem de kurutma işlemleri sırasında çeşitli gerilimler yaratır. Bu gerilimler genellikle aglomerasyon nedeniyle partikül boyutunu önemli ölçüde artırır. Yetersiz bir kriyoprotektan konsantrasyonu, nanopartiküller etrafında camsı matrisin eksik kaplamasına yol açar, kümelenmeyi destekler ve partikül boyutlarını artırır (Tang ve ark., 2012). Gözenekli vankomisin hidroklorür mikropartiküllerinde dondurarak kurutmada farklı kriyoprotektanların etkinliğini araştırmak için mikropartiküllerin partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli dondurarak kurutmadan önce ve sonra ve devam eden 3 ay boyunca ölçülmüştür. Dondurarak kurutmadan sonraki parametreler, dondurularak kurutulmuş mikropartiküllerin yeniden suda dağıtılmış sıvı formları kullanılarak ölçülmüştür. Örneklerin partikül büyüklüğü (Tablo 4-13), partikül büyüklüğü dağılımı (Tablo 4-14) ve zeta potansiyeli (Tablo 4-14) Zetasizer kullanılarak belirlenmiştir.

Liyofilizasyon sonrası yapılan ölçümlerde genel olarak partikül büyüklüklerinde artış, partikül büyüklüğü dağılımında azalma gözlemlenmiştir. Dondurarak kurutma işleminden önce formülasyonlara katılan kriyoprotektanlar formülasyonların zeta potansiyelinde negatif yönde bir artışa neden olduğu görülmektedir (Tablo 4-14). Dondurarak kurutmadan önce daha yüksek bir PDI, yüksek partikül iç dağılımını ve tek tip olmayan boyut dağılımını gösterir. Dondurarak kurutmadan sonra PDI değerleri azaldı, bu da parçacık boyutu dağılımının tekdüze ve kararlı hale geldiğini gösterir. Bu veriler Wu ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış olduğu araştırmalarla örtüşmektedir.

Kullanılan kriyoprotektanlar içerisinde sukroz en iyi kriyoprotektandır, çünkü sukroz içeren yeniden suda dağıtılmış mikropartiküllerin partikül büyüklüğü dondurarak kurutma işlemi öncesine en yakın ve partikül dağılımları en düşüktür.

Özetle, sukroz 1/3 oranında mikropartiküllere karıştırıldığında vankomisin hidroklorür mikropartiküllerinin partikül morfolojisini korumak, PDI değerlerini düşürmek ve stabil partiküller üretmek için uygun bir kriyoprotektandır.

Sivadas ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Mikropartiküller kuru toz formülasyonlarının tek başına kullanılmasının aerolize olabilmesinde yetersiz kaldığı, mikropartiküllerin zayıf akış ve agregasyon gösterdiği bildirilmiştir. (Sivadas ve ark., 2008). Bu nedenden dolayı mikropartiküllerin akış özelliğini düzenlemek ve inhalasyon için uygun hale getirmek için uygun yardımcı maddeye ihtiyaç duyulduğunu düşünmekteyiz. Tez çalışmamızda bu sorunu çözmek için, piyasada hazır bulunan, farklı partikül büyüklüklerindeki laktozlar (Respitose® sv-003, Respitose® ml-003, Inhalac®230 ve Lactohale® 200) kullanılmıştır.

Akciğerlerin derin bölgelerine nüfus edebilecek boyutlarda, yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olan ve 24 saat boyunca kontrollü salım yapabilen ABC-7,5 formülasyonu *in vitro* performans testlerinde NGI ve DUSA analizleri için uygun bulunmuştur. Farklı boyutlardaki laktozlarla 1:5 oranında karıştırılarak kapsüllere doldurulmuştur (Şekil 4-8). Daha sonraki analizler için hazır olan formülasyonların bölüm 3.5.8.1’de anlatıldığı gibi NGI analizi yapılmış ve şekil 4-10’da gösterilen sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçların MMAD calculator kullanılarak analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarından (Tablo 4-17) da görüldüğü gibi formülasyonların MMAD değerleri 3,93-4,66 µm aralığına değişmektedir. MMAD değerlerinin 5 µm’den düşük olması bu formülasyonların respiratuvar bölgenin alt kısımlarında tutulabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda 3 µm daha büyük mikropartiküller hem ilacın sistemik dolaşıma geçmesini hem de alveolar makrofajı engellemektedir. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında laktozlar yardımıyla hazırlanan formülasyonların akışının aerodinamik davranışlarının ve akciğerlerde dağılımının iyileştiği sonucuna varılmıştır. Mikropartiküler kuru toz formülasyonları inhale edildiğinde, taşıyıcı madde olan laktozun ağız ve farenks bölgesine yapışarak kalması, daha hafif ve küçük partikül boyutlarında (1-5 µm) olan mikropartiküllerin ise akciğerlerin derin bölgelerine dağılması planlanmaktadır. Bu bilgiyi incelemek için ince

partikül kütlesi (FPM) hesaplanmıştır. Tablo 4-17’de gösterildiği gibi formülasyonların FPM yüzdeleri %35,01-47,39 aralığında değişmektedir. Bu değerler benzer çalışmalarla kıyaslandığında inhale edilen ilacın yeterli miktarının istenen bölgeye ulaştığını göstermektedir (Buttini ve ark., 2016), (Elia ve ark., 2016), (Abadelah ve ark., 2017). İncelenen formülasyonlar içerisinde İL-230 formülasyonu diğerleriyle kıyaslandığında daha yüksek FMP yüzdesi gösterdiği görülmüştür. Bu da mikropartiküller ile taşıyıcı laktoz arasında karışmanın daha iyi olması ve inhalasyon sırasında teslim edilen dozun daha yüksek olması nedeninden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kapsüllere doldurulan son formülasyonların teslim edilen doz bakımından incelenmesi için Bölüm 3.5.8.2’de anlatıldığı gibi DUSA analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları Şekil 4-11’de verilmiştir. DUSA analizi iki farklı kapsül türüyle (HPMC, SJK) yapılmıştır. Sonuçlara bakıldığında HPMC kapsül kullanılan formülasyonlar, SJK kullanılan formülasyonlara kıyasla daha fazla mikropartikülün inhalasyonunu sağlamıştır. Bunun ana nedeni, inhalasyon sırasında sert jelatin kapsüllerin kırılarak mikropartiküllerin akışına engel olması olarak görülmektedir. Farklı boyutlardaki laktozların teslim edilen doza etkisine bakıldığında yine İL-230 formülasyonunun diğer formülasyonlarla kıyasla daha fazla mikropartikülü teslim ettiği görülmektedir. Bu veriler aynı zamanda NGI analizinin sonuçlarıyla kıyaslandığında benzer sonuçlar vermiştir.

Uygun özelliklere sahip olduğu belirlenen formülasyonlar (ABC-5, ABC-7,5 ve SBC-5) ve karşılaştırmak açısından gözeneksiz hazırlanan formülasyon (NOP) SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4-12’de formülasyonların poröz yapıları görülmektedir.

Literatür taramaları sonucunda vankomisin hidroklorürün *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MIC) 2,4 µg/ml olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Serri ve ark., 2019). Tez çalışmamızda hazırlamış olduğumuz Vankomisin hidroklorürün poröz yapıdaki mikropartikül formülasyonlarının *in vitro* salım çalışmasında etken maddenin mikropartiküllerden ani salımı ile minimum inhibisyon konsantrasyonunun üzerinde bir konsantrasyona ulaştığı saptanmıştır (Tablo 4-12). Dolayısıyla bu bilgiye dayanarak ayrıca formülasyonların mikrobiyolojik aktivite tayini planlanmamıştır.

Tez çalışmamızdan akciğerlere lokal uygulanması için hazırlanmış vankomisin hidroklorürün mikropartiküler kuru toz formülasyonları yüksek enkapsülasyon etkinliği ve yüksek ürün verimliliği göstermiştir. İn vitro aerolizasyon performans testleri sayesinde hazırlanan formülasyonların akciğerlerin derin bölgelerine ulaşabildiği ve minimum inhibisyon konsantrasyonunun üzerinde bir konsantrasyona ulaştığı görülmüştür. Tüm bu veriler göz önüne alındığında vankomisin hidroklorürün mikropartiküler kuru toz formülasyonlarının, i.v. kullanımda ortaya çıkan sistemik yan etkileri de (özellikle nefrotoksisite) dikkate alındığında daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak elde edilen mikropartiküllerin *in vivo* çalışmalar ile de etkinliğini kanıtlanması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Abadelah, M., Hazim, F., Chrystyn, H., Bagherisadeghi, G., Rahmoune, H., & Larhrib, H. (2017). Effect of maximum inhalation flow and inhaled volume on formoterol drug deposition in-vitro from an Easyhaler® dry powder inhaler. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 180-187.
- Agnihotri, S. M., & Vavia, P. R. (2009). Diclofenac-loaded biopolymeric nanosuspensions for ophthalmic application. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 5(1), 90-95.
- Ahlin, P., Kristl, J., Kristl, A., & Vrečer, F. (2002). Investigation of polymeric nanoparticles as carriers of enalaprilat for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 239(1-2), 113-120.
- Allegra, L., Della Patrona, S., & Petrigni, G. (2012). Hyaluronic Acid. *Heparin-A Century of Progress*, 385-401.
- Anderson, J. M., & Shive, M. S. (2012). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 72-82.
- Arnold, M. M., Gorman, E. M., Schieber, L. J., Munson, E. J., & Berkland, C. (2007). NanoCipro encapsulation in monodisperse large porous PLGA microparticles. *Journal of Controlled Release*, 121(1-2), 100-109.
- Bae, S. E., Son, J. S., Park, K., & Han, D. K. (2009). Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and regenerative medicine. *Journal of Controlled Release*, 133(1), 37-43.
- Baker, G. L., Gupta, A., Clark, M. L., Valenzuela, B. R., Staska, L. M., Harbo, S. J., ... & Dill, J. A. (2008). Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicological sciences*, 101(1), 122-131.
- Baxter, J. L., Kukura, J., & Muzzio, F. J. (2005). Hydrodynamics-induced variability in the USP apparatus II dissolution test. *International journal of pharmaceutics*, 292(1-2), 17-28.
- Buttini, F., Brambilla, G., Copelli, D., Sisti, V., Balducci, A. G., Bettini, R., & Pasquali, I. (2016). Effect of flow rate on *in vitro* aerodynamic performance of NEXThaler® in comparison with Diskus® and Turbohaler® dry powder inhalers. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, 29(2), 167-178.

- Capan, Y., Jiang, G., Giovagnoli, S., Na, K. H., & DeLuca, P. P. (2003). Preparation and characterization of poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of human growth hormone. *Aaps Pharmscitech*, 4(2), 147-156.
- Carreno, J. J., Kenney, R. M., & Lomaestro, B. (2014). Vancomycin-associated renal dysfunction: where are we now? *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 34(12), 1259-1268.
- Cevher, E., Orhan, Z., Mülazımoğlu, L., Şensoy, D., Alper, M., Yıldız, A., & Özsoy, Y. (2006). Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *International journal of pharmaceutics*, 317(2), 127-135.
- Çelik, G., Kaya, A., & Çiledağ, A. (2010). KOAH'da bronkodilatör tedavi ve destek tedavileri. *TTD Toraks Cerrahisi Bülteni*, 1, 124-34.
- Chow, A. H., Tong, H. H., Chattopadhyay, P., & Shekunov, B. Y. (2007). Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharmaceutical research*, 24(3), 411-437.
- Cookson, W. O., Cox, M. J., & Moffatt, M. F. (2018). New opportunities for managing acute and chronic lung infections. *Nature reviews Microbiology*, 16(2), 111.
- Dailey, L. A., Jekel, N., Fink, L., Gessler, T., Schmehl, T., Wittmar, M., ... & Seeger, W. (2006). Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicology and applied pharmacology*, 215(1), 100-108.
- De Hoog, M., Mouton, J. W., & van den Anker, J. N. (2005, April). New dosing strategies for antibacterial agents in the neonate. *In Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 10, No. 2, pp. 185-194). WB Saunders.
- Deshmukh, R., Wagh, P., & Naik, J. (2016). Solvent evaporation and spray drying technique for micro-and nanospheres/particles preparation: A review. *Drying technology*, 34(15), 1758-1772.
- Dolovich, M. B., Kuttler, A., Dimke, T. J., & Usmani, O. S. (2019). Biophysical model to predict lung delivery from a dual bronchodilator dry-powder inhaler. *International journal of pharmaceutics: X*, 1, 100018.
- Edwards, D. A., Ben-Jebria, A., & Langer, R. (1998). Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *Journal of applied physiology*, 85(2), 379-385.

- Edwards, D. A., Hanes, J., Caponetti, G., Hrkach, J., Ben-Jebria, A., Eskew, M. L., ... & Langer, R. (1997). Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science*, 276(5320), 1868-1872.
- Elhissi, A. (2017). Liposomes for pulmonary drug delivery: the role of formulation and inhalation device design. *Current pharmaceutical design*, 23(3), 362-372.
- Elia, A., Cocchi, M., Cottini, C., Riolo, D., Cafiero, C., Bosi, R., & Lutero, E. (2016). Multivariate data analysis to assess dry powder inhalers performance from powder properties. *Powder Technology*, 301, 830-838.
- El-Sherbiny, I. M., El-Baz, N. M., & Yacoub, M. H. (2015). Inhaled nano-and microparticles for drug delivery. *Global Cardiology Science and Practice*, 2015(1), 2.
- El-Sherbiny, I. M., McGill, S., & Smyth, H. D. (2010). Swellable microparticles as carriers for sustained pulmonary drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(5), 2343-2356.
- Fonseca, C., Simoes, S., & Gaspar, R. (2002). Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and *in vitro* anti-tumoral activity. *Journal of controlled release*, 83(2), 273-286.
- Frijlink, H. W., & De Boer, A. H. (2004). Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 1(1), 67-86.
- Garonzik, S. M., Li, J., Thamlikitkul, V., Paterson, D. L., Shoham, S., Jacob, J., ... & Nation, R. L. (2011). Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(7), 3284-3294.
- Gkatzis, K., Taghizadeh, S., Huh, D., Stainier, D. Y., & Bellusci, S. (2018). Use of 3D organoids and lung-on-a-chip methods to study lung development, regeneration and disease. *European Respiratory Journal*, 1800876.
- Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L., & Davis, S. S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water-soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 57(2), 171-185.
- Hachicha, W., Kodjikian, L., & Fessi, H. (2006). Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters. *International journal of pharmaceuticals*, 324(2), 176-184.

- Hadinoto, K., Phanapavudhikul, P., Kewu, Z., & Tan, R. B. (2007). Dry powder aerosol delivery of large hollow nanoparticulate aggregates as prospective carriers of nanoparticulate drugs: effects of phospholipids. *International journal of pharmaceutics*, 333(1-2), 187-198.
- Holmes, N. E., & Howden, B. P. (2014). What's new in the treatment of serious MRSA infection? *Current opinion in infectious diseases*, 27(6), 471-478.
- Huang, Y. Y., & Wang, C. H. (2006). Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *Journal of controlled release*, 113(1), 9-14.
- Islam, N., & Gladki, E. (2008). Dry powder inhalers (DPIs)—a review of device reliability and innovation. *International journal of pharmaceutics*, 360(1-2), 1-11.
- Jacob, A., Morley, M., Hawkins, F., McCauley, K. B., Jean, J. C., Heins, H., ... & Hinds, A. (2017). Differentiation of human pluripotent stem cells into functional lung alveolar epithelial cells. *Cell stem cell*, 21(4), 472-488.
- Jaspart, S., Bertholet, P., Piel, G., Dogné, J. M., Delattre, L., & Evrard, B. (2007). Solid lipid microparticles as a sustained release system for pulmonary drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 65(1), 47-56.
- Jawahar, N., & Reddy, G. (2012). Nanoparticles: A novel pulmonary drug delivery system for tuberculosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(8), 1901.
- Kim, H. K., Chung, H. J., & Park, T. G. (2006). Biodegradable polymeric microspheres with “open/closed” poröz for sustained release of human growth hormone. *Journal of Controlled Release*, 112(2), 167-174.
- Kim, H., Lee, J., Kim, T. H., Lee, E. S., Oh, K. T., Lee, D. H., ... & Youn, Y. S. (2011). Albumin-coated porous hollow poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles bound with palmityl-acylated exendin-4 as a long-acting inhalation delivery system for the treatment of diabetes. *Pharmaceutical research*, 28(8), 2008-2019.
- Kim, I., Byeon, H. J., Kim, T. H., Lee, E. S., Oh, K. T., Shin, B. S., ... & Youn, Y. S. (2012). Doxorubicin-loaded highly porous large PLGA microparticles as a sustained-release inhalation system for the treatment of metastatic lung cancer. *Biomaterials*, 33(22), 5574-5583.
- Komatsu, M., Tagawa, K., Kawata, M., & Goto, S. (1983). Biopharmaceutical evaluation of gelatin microcapsules of sulfonamides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31(1), 262-268.

- Labiris, N. R., Bosco, A. P., & Dolovich, M. B. (2006). Aerosols as Drug Carriers. *Nanoparticulates as Drug Carriers*, 367-395.
- Lee, J., Oh, Y. J., Lee, S. K., & Lee, K. Y. (2010). Facile control of porous structures of polymer microspheres using an osmotic agent for pulmonary delivery. *Journal of controlled release*, 146(1), 61-67.
- Lee, S. J., & McClements, D. J. (2010). Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 560-569.
- Lee, T., Pang, S., Abraham, S., & Coombs, G. W. (2019). Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: the past, the present and the future. *Journal of global antimicrobial resistance*, 16, 36-47.
- Li, M., Rouaud, O., & Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of pharmaceutics*, 363(1-2), 26-39.
- Liang, Z., Ni, R., Zhou, J., & Mao, S. (2015). Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. *Drug Discovery Today*, 20(3), 380-389.
- Lin, H. L., Wan, G. H., Chen, Y. H., Fink, J. B., Liu, W. Q., & Liu, K. Y. (2012). Influence of nebulizer type with different pediatric aerosol masks on drug deposition in a model of a spontaneously breathing small child. *Respiratory care*, 57(11), 1894-1900.
- Marsot, A., Boulamery, A., Bruguerolle, B., & Simon, N. (2012). Vancomycin. *Clinical pharmacokinetics*, 51(1), 1-13.
- Mukherjee, B., Santra, K., Pattnaik, G., & Ghosh, S. (2008). Preparation, characterization and in-vitro evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers. *International journal of nanomedicine*, 3(4), 487.
- Oh, Y. J., Lee, J., Seo, J. Y., Rhim, T., Kim, S. H., Yoon, H. J., & Lee, K. Y. (2011). Preparation of budesonide-loaded porous PLGA microparticles and their therapeutic efficacy in a murine asthma model. *Journal of controlled release*, 150(1), 56-62.
- Palmer, L. B., & Smaldone, G. C. (2014). Reduction of bacterial resistance with inhaled antibiotics in the intensive care unit. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 189(10), 1225-1233.

- Paranjpe, M., & Müller-Goymann, C. C. (2014). Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. *International journal of molecular sciences*, 15(4), 5852-5873.
- Péan, J. M., Venier-Julienne, M. C., Boury, F., Menei, P., Denizot, B., & Benoit, J. P. (1998). NGF release from poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres. Effect of some formulation parameters on encapsulated NGF stability. *Journal of Controlled Release*, 56(1-3), 175-187.
- Pham, D. D., Fattal, E., & Tsapis, N. (2015). Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment. *International journal of pharmaceutics*, 478(2), 517-529.
- Pilcer, G., & Amighi, K. (2010). Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 392(1-2), 1-19.
- Quon, B. S., Goss, C. H., & Ramsey, B. W. (2014). Inhaled antibiotics for lower airway infections. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(3), 425-434.
- Razvi, S., Quittell, L., Sewall, A., Quinton, H., Marshall, B., & Saiman, L. (2009). Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*, 136(6), 1554-1560.
- Rodvold, K. A., & McConeghy, K. W. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clinical infectious diseases*, 58(suppl_1), S20-S27.
- Rouse, J. J., Whateley, T. L., Thomas, M., & Eccleston, G. M. (2007). Controlled drug delivery to the lung: Influence of hyaluronic acid solution conformation on its adsorption to hydrophobic drug particles. *International journal of pharmaceutics*, 330(1-2), 175-182.
- Ryan, G., Singh, M., & Dwan, K. (2011). Inhaled antibiotics for long-term therapy in cystic fibrosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3).
- Rybak, M. J., Lomaestro, B. M., Rotschahfer, J. C., Moellering Jr, R. C., Craig, W. A., Billeter, M., ... & Levine, D. P. (2009). Vancomycin therapeutic guidelines: a summary of consensus recommendations from the infectious diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clinical infectious diseases*, 49(3), 325-327.
- Serri, A., Mahboubi, A., Zarghi, A., & Moghimi, H. R. (2019). PAMAM-dendrimer enhanced antibacterial effect of vancomycin hydrochloride against gram-negative bacteria. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 22, 10-21.

- Saz, E. U., Midyat, L., Muhterem, D. U. Y. U., Ozananar, Y., KARAPINAR, B., & ÖZÇETİN, M. (2009). Akut bronşiyolitli olguların acil servisteki tedavilerinde nebulizatör veya aracı tüp kullanımının etkinliğinin karşılaştırılması. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*, 40(1), 27-31.
- Siepmann, J., & Peppas, N. A. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced drug delivery reviews*, 64, 163-174.
- Smyth, H. D., & Hickey, A. J. (Eds.). (2011). Controlled pulmonary drug delivery. *Springer Science & Business Media*.
- Stocks, J. A. N. E. T., & Hislop, A. A. (2002). *Structure and function of the respiratory system* (pp. 47-104). Marcel Dekker, NY, USA.
- Surendrakumar, K., Martyn, G. P., Hodgers, E. C. M., Jansen, M., & Blair, J. A. (2003). Sustained release of insulin from sodium hyaluronate based dry powder formulations after pulmonary delivery to beagle dogs. *Journal of Controlled Release*, 91(3), 385-394.
- Tang, W. Y., Song, Y. Z., & Deng, Y. H. (2012). Progress on liposomal lyoprotectants and the mechanism of action. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 7.
- Taylor, K. (2002). Pulmonary drug delivery. *Any screen. Any time. Anywhere.*, 653.
- Tewes, F., Munnier, E., Antoon, B., Okassa, L. N., Cohen-Jonathan, S., Marchais, H., ... & Chourpa, I. (2007). Comparative study of doxorubicin-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 66(3), 488-492.
- Thote, A. J., Chappell Jr, J. T., Kumar, R., & Gupta, R. B. (2005). Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. *Drug development and industrial pharmacy*, 31(1), 43-57.
- Traini, D., & Young, P. M. (2009). Delivery of antibiotics to the respiratory tract: an update. *Expert opinion on drug delivery*, 6(9), 897-905.
- Tsifansky, M. D., Yeo, Y., Evgenov, O. V., Bellas, E., Benjamin, J., & Kohane, D. S. (2008). Microparticles for inhalational delivery of antipseudomonal antibiotics. *The AAPS journal*, 10(2), 254-260.

- Ungaro, F., d'Angelo, I., Miro, A., La Rotonda, M. I., & Quaglia, F. (2012). Engineered PLGA nano-and micro-carriers for pulmonary delivery: challenges and promises. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(9), 1217-1235.
- Ungaro, F., De Rosa, G., Miro, A., Quaglia, F., & La Rotonda, M. I. (2006). Cyclodextrins in the production of large porous particles: development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(5), 423-432.
- Usta, D. Y., & Teksin, Z. S. (2015). *In Vitro* Çözünme Hizi Çalışmalarında Yeni Yaklaşımlar/New approaches to *in vitro* dissolution rate studies. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(1), 33.
- Wu, H. Y., Sun, C. B., & Liu, N. (2019). Effects of different cryoprotectants on microemulsion freeze-drying. *Innovative food science & emerging technologies*, 54, 28-33.
- Yang, Y. Y., Chung, T. S., & Ng, N. P. (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(3), 231-241.
- Yang, Y., Bajaj, N., Xu, P., Ohn, K., Tsifansky, M. D., & Yeo, Y. (2009). Development of highly porous large PLGA microparticles for pulmonary drug delivery. *Biomaterials*, 30(10), 1947-1953.
- Zakeri-Milani, P., Loveymi, B. D., Jelvehgari, M., & Valizadeh, H. (2013). The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 174-181.
- Zaura, E., Brandt, B. W., Teixeira de Mattos, M. J., Buijs, M. J., Caspers, M. P., Rashid, M. U., Weintraub, A., Nord, C. E., Savell, A., Hu, Y., Coates, A. R., Hubank, M., Spratt, D. A., Wilson, M., Keijser, B. J., & Crielaard, W. (2015). Same Exposure but Two Radically Different Responses to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome versus Long-Term Microbial Shifts in Feces. *mBio*, 6(6), e01693-15.
- Zeng, X. M., Martin, G. P., & Marriott, C. (2000). *Particulate Interactions in Dry Powder Formulation for Inhalation*. CRC Press.