

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

**ANTİBİYOTİK İÇEREN KURU TOZ İNHALER
FORMÜLASYONU TASARIMI VE PERMEABİLİTE
ÇALIŞMALARI**

Ecz. Yağmur AKDAĞ ÇAYLI

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2017**

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

**ANTİBİYOTİK İÇEREN KURU TOZ İNHALER
FORMÜLASYONU TASARIMI VE PERMEABİLİTE
ÇALIŞMALARI**

Ecz. Yağmur AKDAĞ ÇAYLI

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Levent ÖNER

ANKARA

2017

**ANTİBİYOTİK İÇEREN KURU TOZ İNHALER FORMÜLASYONU
TASARIMI VE PERMEABİLİTE ÇALIŞMALARI**

Ecz. Yağmur Akdağ Çaylı

Bu çalışma 26.04.2017 tarihinde jürimiz tarafından “Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Selma ŞAHİN

(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Levent ÖNER

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN

(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

Üye:

Doç. Dr. Hakan EROĞLU

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Yrd. Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK

(İnönü Üniversitesi)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

03 Mayıs 2017

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenikle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)
- x **Tezimin/Raporumun 26.04.2022 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)
- **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

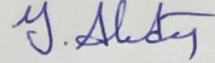
26/04/2017

Y. Akdağ

Yağmur AKDAĞ ÇAYLI

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Levent ÖNER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Ecz. Yağmur AKDAĞ ÇAYLI

TEŞEKKÜR

Çalışmalarına yön veren, tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Levent Öner'e,

Tez çalışmam süresince bilgisi ve sabrı ile her zaman yanımda olan, her konuda desteğini hissettiğim hocam Prof. Dr. Selma Şahin'e,

Hücre kültürü çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. İmran Vural'a,

Eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Aerodinamik parametre ölçümlerini yaptığım Parma Üniversitesi'nden Prof. Dr. Paolo Colombo, Prof. Dr. Francesca Buttini, Dr. Serena Montanari, Dr. Anna Giulia Balducci'ye,

Tezimin her aşamasında bana yardımcı olan, bilgisi, sabrı ve sonsuz anlayışı ile bana güç ve destek veren Dr. Ecz. Tuğba Gülsün İnal ve Ecz. Nihan İzat başta olmak üzere tüm Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı ailesine,

Tüm yaşamım boyunca olduğu gibi tez çalışmam sırasında da daima yanımda olan, sevgi ve desteğini esirgemeyen, bana inanan ve güvenen annem Neriman Akdağ, babam Hüseyin Akdağ ve kardeşlerim Burcu Akdağ, Ezgi Akdağ ve Eren Akdağ'a,

Son olarak her zaman yanımda olup hayat yükümü hafifleten eşim Ferhat Çaylı'ya teşekkür ederim.

Tezimi, bana hayatı güzel kılan eşim Ferhat Çaylı'ya ithaf ederim.

ÖZET

Akdağ Çaylı, Y., Antibiyotik İçeren Kuru Toz İnhaler Formülasyonu Tasarımı ve Permeabilite Çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. Bu tezin amacı, kistik fibrozis hastalığında akciğerde görülen enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere antibiyotik ve mukolitik kombinasyonu ile kuru toz inhaler formülasyonu geliştirmektir. Bu amaçla, tez kapsamında siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotikleri ile asetilsistein ve dornaz alfa mukolitiklerini içeren formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyonda mukolitik olması, akciğer yüzeyindeki mukus viskozitesini azaltarak, antibiyotiğin mukusa nüfuz etmesini sağlayacaktır. Ayrıca inhaler formülasyonu ile ilaç doğrudan etki bölgesine uygulanmış olacak, bu da hem etkinliği artıracak hem de sistemik yan etkilerin görülmesini önleyecektir. Geliştirilen kuru toz inhaler formülasyonlarının akciğerin derinlerine kadar ilerleyebilmesi için, partiküller 5 µm'den küçük olacak şekilde hazırlanmıştır. Formülasyonların hazırlanmasında, bilyalı değirmen, homojenizatör ve püskürterek kurutma yöntemleri kullanılmıştır. Siprofloksasin içeren formülasyonlara çözünürlük çalışmalarının yanı sıra çözünme deneyleri de yapılmıştır. Çözünürlük değişmezken, mikronizasyon ile çözünmenin hızlandığı görülmüştür. Etkin maddelerin ve formülasyonların; FT-IR, DSC, TGA, XRD ve SEM analizleri yapılmış, sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur. Formülasyonların aerodinamik özellikleri, Andersen Cascade Impactor cihazı ile incelenmiş, levofloksasin içeren formülasyonlar ile daha iyi aerosolizasyon özelliği elde edilmiştir. Calu-3 hücreleri ile hem sıvı hem de hava ara yüzeyinde permeabilite çalışmaları yapılmıştır. Permeabilite çalışmalarında levofloksasinin permeabilitesinin, siprofloksasinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Çözelti ile elde edilen permeabilite değerlerinin, kuru toz ile elde edilen permeabilite değerlerinden daha düşük olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kuru toz inhaler, siprofloksasin, levofloksasin, mukolitik, kistik fibrozis

Bu çalışma TÜBİTAK (SBAG-213S043) ve Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (14493) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Akdag Cayli, Y., Design of the Dry Powder Inhaler Formulation Containing Antibiotic and Permeability Studies, Hacettepe University Faculty of Pharmacy Department of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017. The aim of this thesis is to develop dry powder inhaler formulation with antibiotic and mucolytic combination to use in the treatment of the lung infection in cystic fibrosis disease. For this purpose, in this thesis, formulations containing ciprofloxacin and levofloxacin as antibiotics and acetylcysteine and DNase as mucolytics were prepared. Presence of a mucolytic in the same formulation will provide the penetration of the antibiotic by decreasing the mucus viscosity on the lung surface. Furthermore, the drug will be directly administered to *site of action* via inhaler formulation, and this will increase the efficiency and also prevent systemic side effects of the drug. To prepare the formulations, ball milling, homogenization and spray drying methods were used. Dry powder inhaler formulations were developed that had particles smaller than 5 μm in order to reach deeper areas of the lung. Besides the solubility studies, the dissolution study was performed for ciprofloxacin containing formulations. While the solubility was unchanged, the micronization accelerated the dissolution. FT-IR, DSC, TGA, XRD and SEM analysis were performed for active ingredients and the formulations, and results were consistent with the literature. Aerodynamic parameters were evaluated by Andersen Cascade Impactor, better aerosolization properties were obtained with levofloxacin containing formulations. Permeability studies were carried out with the Calu-3 cells, on both liquid covered and air interfaced culture. In the permeability studies, it was observed that, permeability of levofloxacin is higher than permeability of ciprofloxacin. Finally it was found that permeability values obtained from solution were lower than permeability values obtained from dry powder.

Key Words: Dry powder inhaler, ciprofloxacin, levofloxacin, mucolytic, cystic fibrosis

This study was supported by TUBITAK (SBAG-213S043) and Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (14493).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xv
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xxvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Solunum Sistemi	3
2.1.1. Akciğerlerin Yapısı	3
2.1.2. Respiratuar Bölgede Partiküllerin Tutulmasına Etki Eden Faktörler	4
2.1.3. Pulmoner Epitelden Geçiş Yolları	6
2.1.4. İn hale Edilen Partiküllerin Respiratuar Bölgeden Uzaklaştırılması	8
2.1.5. Akciğer Hastalıkları	8
2.1.6. Kistik Fibrozis	9
2.1.7. Akciğer Hastalıklarında İlaç Uygulaması	11
2.1.8. Akciğer Enfeksiyonlarının Tedavisinde İn haler Kullanımı	11
2.2. İn halasyon Sistemleri	13
2.2.1. Nebülizer	15
2.2.2. Ölçülü Doz İn haler	15
2.2.3. Kuru Toz İn haler (KTİ)	16
2.3. Kuru Toz İn haler Formülasyonların Üretimi	24
2.3.1. Bilyalı Değirmen Yöntemi	25

2.3.2. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi	26
2.3.3. Püskürterek Kurutma Yöntemi	27
2.4. İnhaler Partiküllerinin Aerodinamik Parametreleri	30
2.4.1. Cam İkili Ayırıştırıcı (Glass Twin Impinger)	31
2.4.2. Marple Miller Cascade Impactor	32
2.4.3. Andersen Kademeli Ayırıştırıcı (Andersen Cascade Impactor)	33
2.4.4. Çok Aşamalı Sıvı Ayırıştırıcı (Multi Stage Liquid Impinger)	36
2.4.5. Yeni Nesil Ayırıştırıcı (Next Generation Impactor)	37
2.5. Calu-3 Hücre Hattı ile Permeabilite Çalışmaları	39
2.6. Siprofloksasin	40
2.6.1. Fizikokimyasal Özellikler	40
2.6.2. Farmakolojik Etki Mekanizması	41
2.6.3. Farmakokinetik Özellikler	42
2.6.4. Yan etkiler	42
2.6.5. Ticari Preparatlar	42
2.7. Levofloksasin	42
2.7.1. Fizikokimyasal Özellikler	42
2.7.2. Farmakolojik Etki Mekanizması	43
2.7.3. Farmakokinetik Özellikler	44
2.7.4. Yan etkiler	44
2.7.5. Ticari Preparatlar	44
2.8. Asetilsistein	44
2.8.1. Fizikokimyasal Özellikler	44
2.8.2. Farmakolojik Etki Mekanizması	45
2.8.3. Farmakokinetik Özellikler	45
2.8.4. Yan etkiler	45
2.8.5. Ticari Preparatlar	45
2.9. Dornaz alfa	46
2.9.1. Fizikokimyasal Özellikler	46
2.9.2. Farmakolojik Etki Mekanizması	46
2.9.3. Farmakokinetik Özellikler	46
2.9.4. Yan Etkiler	47

2.9.5. Ticari Preparatlar	47
3. GEREÇ ve YÖNTEM	48
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler, Malzemeler	48
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	48
3.1.2. Kullanılan Aletler	49
3.2. Etkin Maddeler Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler	50
3.2.1. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin UV Spektrumu	50
3.2.2. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR)	50
3.2.3. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi (DSC)	50
3.2.4. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Termogravimetrik Analizi (TGA)	51
3.2.5. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)	51
3.2.6. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi (SEM)	51
3.2.7. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi	51
3.3. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsistein Maddelerinin Miktar Tayini	52
3.3.1. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi	53
3.3.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu	53
3.4. Dornaz Alfa Maddesinin Miktar Tayini	56
3.5. Kuru Toz İnhaler (KTİ) Hazırlama Yöntemi	56
3.5.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	56
3.5.2. Formülasyon Çalışmaları	59
3.6. Kuru Toz İnhaler Formülasyonları Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler	62
3.6.1. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR)	62

3.6.2. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Analizi (DSC)	62
3.6.3. Formülasyonların Termogravimetrik Analizi (TGA)	62
3.6.4. Formülasyonların X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)	63
3.6.5. Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi (SEM)	63
3.6.6. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi	63
3.7. Formülasyonların Antibiyotik ve Mukolitik İçeriklerinin Tayini	63
3.8. Çözünürlük Tayini	64
3.9. Çözünme Deneyi	65
3.10. Formülasyonların Anderson Cascade Impactor ile Aerodinamik Ölçütlerinin Hesaplanması	66
3.11. Etkin Madde ve Formülasyonlara İlişkin Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışmaları	68
3.11.1. Calu-3 Hücrelerinin Çözülmesi ve Çoğaltılması	68
3.11.2. Pasajlama	68
3.11.3. MTT Yöntemi ile Calu-3 Hücrelerinin Canlılığının Değerlendirilmesi	69
3.11.4. Geçiş Çalışmaları İçin Hücrelerin Hazırlanması	69
3.11.5. Calu-3 Hücrelerinin Bütünlüğünün Transepitel Elektriksel Rezistans (TEER) Ölçümü ve Inverted Mikroskop Görüntüleri ile Değerlendirilmesi	70
3.11.6. Geçiş Çalışmaları	70
3.11.7. İstatistiksel Analiz	72
4. BULGULAR	73
4.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar	73
4.1.1. Siprofloksasin, Levofloksasin, Asetilsistein ve Dornaz alfanın UV Spektrumu	73
4.1.2. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin FT-IR Spektrumu	76

4.1.3. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Analizi (DSC)	80
4.1.4. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Termogravimetrik Analizi (TGA)	83
4.1.5. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)	87
4.1.6. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi (SEM)	92
4.1.7. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi	93
4.2. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsistein Maddelerinin Miktar Tayini	95
4.2.1. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu	95
4.3. Dornaz Alfa Maddesinin Miktar Tayini	110
4.4. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler	111
4.4.1. Formülasyonların FT-IR Spektrumları	111
4.4.2. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Analizi (DSC)	115
4.4.3. Formülasyonların Termogravimetrik Analizi (TGA)	118
4.4.4. Formülasyonların X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)	125
4.4.5. Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi (SEM)	129
4.4.6. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi	134
4.5. Formülasyonların Antibiyotik ve Mukolitik İçeriklerinin Tayini	138
4.6. Çözünürlük Tayini	139
4.7. Çözünme Deneyi	140
4.8. Aerodinamik Ölçütler	144
4.9. Etkin Madde ve Formülasyonlara İlişkin Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışmaları	174
4.9.1. MTT Yöntemi İle İn Vitro Hücre Canlılığının İncelenmesi	174
4.9.2. Calu-3 Hücrelerinin Bütünlüğünün TEER (Transepitel Elektriksel Rezistans) Ölçümü ile Değerlendirilmesi	174

4.9.3. Calu-3 Hücrelerinin Inverted Mikroskop ile Görüntülenmesi	175
4.9.4. Geçiş Çalışmaları	175
5. TARTIŞMA	178
5.1. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsistein Maddelerinin Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu	178
5.2. Formülasyon Çalışmaları	179
5.2.1. Formülasyon Hazırlamada Kullanılan Yöntemlerin Değerlendirilmesi	179
5.3. Fizikokimyasal Analizler	181
5.3.1. UV Spektrumu	181
5.3.2. FT-IR Spektrumu	181
5.3.3. DSC Analizi	182
5.3.4. TGA Analizi	184
5.3.5. XRD Analizi	186
5.3.6. SEM Analizi	187
5.3.7. Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi	189
5.4. Formülasyonların Antibiyotik ve Mukolitik İçeriklerinin Tayini	192
5.5. Çözünürlük Tayini	192
5.6. Çözünme Deneyi	193
5.7. Aerodinamik Parametrelerin Değerlendirilmesi	194
5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	196
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	202
7. KAYNAKLAR	205
8. EKLER	
EK-1: Tez Kapsamında Yapılan Çalışmalar	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACI	Andersen Kademeli Ayırıştırıcı (<i>Andersen Cascade Impactor</i>)
AIC	Hava Arayüzeyinde Hücre Kültürü (<i>Air-Interfaced Culture</i>)
ATP	Adenozin Trifosfat (Adenosine triphosphate)
BCA	<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>
BDDCS	Biyofarmasötik İlaç Dağılım Sınıflandırma Sistemi
BSS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
CD	Siklodekstrin (Cyclodextrin)
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
DAD	<i>Diode array detector</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetrik Analiz (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
ED	<i>Emitted dose</i>
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FBS	Fetal Sığır Serumu (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPMC	Hidroksipropil metilselüloz (<i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>)
İPD	İnce Partikül Dozu
İPF	İnce Partikül Fraksiyonu
KOAÇ	Kütle Ortalama Aerodinamik Çap
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KTI	Kuru Toz İnhaler
LCC	Sıvıya Gömülü Hücre Kültürü (<i>Liquid-Covered Culture</i>)
LOD	Saptanabilirlik (<i>Limit of Detection</i>)

LOQ	Miktar tayini sınırı (<i>Limit of Quantification</i>)
MİD	Minimum İnhibisyon Derişimi
MOC	Mikro-Delik Toplayıcı (Micro-Orifice Collector)
MTT	3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
ÖDİ	Ölçülü Doz İnhaler
P_{app}	Görünür permeabilite katsayısı
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PLA	Polilaktid asit
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil Alkol
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
SLN	Katı Lipit Nanopartikül (<i>Solid Lipid Nanoparticle</i>)
SS	Standart Sapma
TEER	Transepitel Elektriksel Rezistans (<i>Transepithelial Electrical Resistance</i>)
TGA	Termogravimetrik Analiz
t_R	Alıkonma zamanı
VK	Varyasyon Katsayısı
XRD	X-Işını Kırınımı Analizi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Bronşların yapısı.	4
2.2. Alveollerin yapısı.	4
2.3. Solunum sisteminin farklı bölgelerinde etkili olan partikül tutulma mekanizmaları.	5
2.4. Partikül boyutuna göre solunum sisteminde tutulma bölgeleri.	6
2.5. Pulmoner epitelden geçiş yolları.	7
2.6. Mukosilier ve alveoler klerens mekanizmaları.	8
2.7. Nebülizer sisteminin şematik gösterimi.	15
2.8. ÖDİ aygıtının şematik gösterimi.	16
2.9. KTİ aygıtlarının sınıflandırılması ve aygıt örnekleri.	18
2.10. Aerolizer® aygıtının parçaları.	18
2.11. Farklı inhaler aygıtlarından elde edilen akış hızına karşı basınç düşmesi grafiği.	19
2.12. Bilyalı değirmen cihazının şematik gösterimi.	26
2.13. Yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminin şematik gösterimi.	27
2.14. Büchi Mini Spray Dryer B-290 cihazının şematik gösterimi (1. Püskürtme gazı, 2. Isıtıcı, 3. Ağızlık, 4. Kurutma haznesi, 5. Siklon, 6. Toplama kabı, 7. Çıkış filtresi, 8. Aspiratör).	28
2.15. Cam ikili ayrıştırıcının şematik gösterimi (A: ağızlık, B: boğaz, C: boyun, D: üst çarpma odası, E: bağlantı tüpü, F: yan kol adaptörü, G: alt jet düzeneği, H: alt çarpma odası) (boyutlar mm cinsindedir).	32
2.16. <i>Marple Miller Cascade Impactor</i> 'un şematik gösterimi.	33
2.17. ACI cihazındaki aşamaların insan solunum sisteminde karşılık geldiği bölgelerin şematik gösterimi.	36
2.18. <i>Multi Stage Liquid Impinger</i> 'in şematik gösterimi.	37
2.19. <i>Next Generation Impactor</i> 'ün şematik gösterimi.	38
2.20. Siprofloksasin hidroklorür monohidratın kimyasal yapısı.	40
2.21. Levofloksasin hemihidratın kimyasal yapısı.	43

2.22.	Asetilsisteinin kimyasal yapısı.	44
3.1.	a) İşlem sonrası ACI cihazında, 5 numaralı aşama plakasında tutulan toz, b) İşlem sonrası 3 numaralı plaka ve yıkanmak üzere alındığı cam kap.	67
3.2.	A) Sıvıya batık (LCC) ve B) hava arayüzeyinde (AIC) büyütülmüş Calu-3 hücrelerinin şematik gösterimi.	70
3.3.	Dry Powder Insufflator™ for Rat – Model DP-4-R aygıtı.	71
4.1.	Siprofloksasinin UV spektrumu.	74
4.2.	Levofloksasinin UV spektrumu.	74
4.3.	Asetilsisteinin UV spektrumu.	75
4.4.	Dornaz alfanın UV spektrumu.	75
4.5.	Siprofloksasinin FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim (<i>transmittance</i>)).	77
4.6.	Levofloksasinin FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).	77
4.7.	Asetilsisteinin FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).	78
4.8.	Siprofloksasin ve asetilsistein maddelerinin fiziksel karışımının FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).	78
4.9.	Levofloksasin ve asetilsistein maddelerinin fiziksel karışımının FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).	79
4.10.	Siprofloksasinin DSC analizi ile elde edilen termogram.	80
4.11.	Levofloksasinin DSC analizi ile elde edilen termogram.	81
4.12.	Asetilsisteinin DSC analizi ile elde edilen termogram.	81
4.13.	Siprofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımının DSC analizi ile elde edilen termogram.	82
4.14.	Levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımının DSC analizi ile elde edilen termogram.	82
4.15.	İşlem görmemiş siprofloksasinin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.	84
4.16.	İşlem görmemiş levofloksasinin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.	85

- 4.17. İşlem görmemiş asetilsisteinin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği. 86
- 4.18. Siprofloksasinin XRD difraktogramı ve A) siprofloksasine ait literatürdeki XRD difraktogramı. 88
- 4.19. Levofloksasinin XRD difraktogramı ve A) levofloksasine ait US 20060276463 A1 patentinde verilen XRD difraktogramı. 89
- 4.20. Asetilsisteinin XRD difraktogramı ve A) asetilsisteine ait literatürdeki XRD difraktogramı. 90
- 4.21. Siprofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımının XRD difraktogramı. 91
- 4.22. Levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımının XRD difraktogramı. 91
- 4.23. Siprofloksasinin SEM görüntüsü (x5000). 92
- 4.24. Levofloksasinin SEM görüntüsü (x1000). 93
- 4.25. Asetilsisteinin SEM görüntüsü (x100). 93
- 4.26. Malvern Mastersizer 2000'den elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı (kırmızı çizgi-işlem görmemiş siprofloksasin; yeşil çizgi-işlem görmemiş levofloksasin). 94
- 4.27. İşlem görmemiş asetilsisteinin Malvern Mastersizer 2000 (kuru toz)'den elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı. 94
- 4.28. İşlem görmemiş etkin maddelerin partikül büyüklüğü dağılımı (ortalama±SS, n=6). 95
- 4.29 Siprofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6). 96
- 4.30. Siprofloksasinin HBSS'de (permeabilite ortamı) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6). 96
- 4.31. Siprofloksasinin pH 6,4 ftalat tamponunda (çözünürlük ve çözünme ortamları) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6). 97
- 4.32. Levofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6). 97

- 4.33. Levofloksasinin HBSS'de (permeabilite ortamı) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6). 98
- 4.34. Levofloksasinin pH 6,4 fosfat tamponunda (çözünme ortamı) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6). 98
- 4.35. Asetilsisteinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6). 99
- 4.36. Asetilsisteinin HBSS'de (permeabilite ortamı) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6). 99
- 4.37. Asetilsisteinin pH 6,4 fosfat tamponunda kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6). 100
- 4.38. Metanol:25 mM KH₂PO₄ (pH:3,0) (28:72) mobil faz sistemindeki siprofloksasin ve levofloksasine (100 µg/mL) ait HPLC kromatogramı (λ=293 nm). 100
- 4.39. Metanol:25 mM KH₂PO₄ (pH:3,0) (28:72) mobil faz sistemindeki asetilsisteine (400 µg/mL) ait HPLC kromatogramı (λ=214 nm). 101
- 4.40. Metanol:25 mM KH₂PO₄ (pH:3,0) (28:72) mobil faz sistemindeki dornaz alfa maddesine (200 µg/mL) ait HPLC kromatogramı (λ=293 nm). 107
- 4.41. pH 6,4 ftalat tamponu sistemindeki siprofloksasine (150 µg/mL) ait HPLC kromatogramı (λ=293 nm). 107
- 4.42. pH 6,4 fosfat tamponu sistemindeki levofloksasin maddesine (400 µg/mL) ait HPLC kromatogramı (λ=293 nm). 107
- 4.43. 10 mM HEPES içeren HBSS transport ortamına ait HPLC kromatogramı (λ=293 nm). 108
- 4.44. 10 mM HEPES içeren HBSS transport ortamında siprofloksasin maddesine (400 µg/mL) ait HPLC kromatogramı (λ=293 nm). 108
- 4.45. 10 mM HEPES içeren HBSS transport ortamında levofloksasin maddesine (400 µg/mL) ait HPLC kromatogramı (λ=293 nm). 108
- 4.46. 10 mM HEPES içeren HBSS transport ortamında asetilsistein maddesine (400 µg/mL) ait HPLC kromatogramı (λ=214 nm). 109

- 4.47. Dornaz alfanın BCA yöntemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu (ortalama \pm SH, n=6). 111
- 4.48. Siprofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim). 112
- 4.49. Siprofloksasin ve asetilsistein içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim). 112
- 4.50. Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim). 113
- 4.51. Levofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim). 113
- 4.52. Levofloksasin ve asetilsistein içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim). 114
- 4.53. Levofloksasin ve dornaz alfa içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim). 114
- 4.54. Siprofloksasin ve dornaz alfa (a), siprofloksasin ve asetilsistein (b), sadece siprofloksasin (c) içeren formülasyonlar ve işlem görmemiş siprofloksasine (d) ait DSC termogramları. 116
- 4.55. Levofloksasin ve dornaz alfa (a), levofloksasin ve asetilsistein (b), sadece levofloksasin (c) içeren formülasyonlar ve işlem görmemiş levofloksasine (d) ait DSC termogramları. 117
- 4.56. Sadece siprofloksasin içeren KTİ'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği. 119
- 4.57. Siprofloksasin-asetilsistein içeren KTİ'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği. 120
- 4.58. Siprofloksasin-dornaz alfa içeren KTİ'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği. 121
- 4.59. Sadece levofloksasin içeren KTİ'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği. 122

- 4.60.** Levofloksasin-asetilsistein içeren KTİ'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği. 123
- 4.61.** Levofloksasin-dornaz alfa içeren KTİ'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği. 124
- 4.62.** Siprofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonunun XRD difraktogramı. 126
- 4.63.** Siprofloksasin ve asetilsistein içeren kuru toz inhaler formülasyonunun XRD difraktogramı. 126
- 4.64.** Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren kuru toz inhaler formülasyonunun XRD difraktogramı. 127
- 4.65.** Levofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonunun XRD difraktogramı. 127
- 4.66.** Levofloksasin ve asetilsistein içeren kuru toz inhaler formülasyonunun XRD difraktogramı. 128
- 4.67.** Levofloksasin ve dornaz alfa içeren kuru toz inhaler formülasyonunun XRD difraktogramı. 128
- 4.68.** Sadece siprofloksasin içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}= 0,111\pm 0,009 \mu\text{m}$, $d_{50}= 0,787\pm 0,009 \mu\text{m}$, $d_{90}= 1,926\pm 0,099 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS). 129
- 4.69.** Siprofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}= 0,099\pm 0,010 \mu\text{m}$, $d_{50}= 0,726\pm 0,028 \mu\text{m}$, $d_{90}= 1,838\pm 0,126 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS). 130
- 4.70.** Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}= 0,087\pm 0,001 \mu\text{m}$, $d_{50}= 1,358\pm 0,039 \mu\text{m}$, $d_{90}= 2,490\pm 0,052 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS). 131

- 4.71.** Sadece levofloksasin içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}= 1,348\pm 0,002 \mu\text{m}$, $d_{50}= 2,100\pm 0,003 \mu\text{m}$, $d_{90}= 3,445\pm 0,012 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS). 132
- 4.72.** Levofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}= 1,250\pm 0,014 \mu\text{m}$, $d_{50}= 1,986\pm 0,029 \mu\text{m}$, $d_{90}= 3,358\pm 0,047 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS). 133
- 4.73.** Levofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}= 1,326\pm 0,009 \mu\text{m}$, $d_{50}= 2,142\pm 0,008 \mu\text{m}$, $d_{90}= 3,673\pm 0,065 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS). 134
- 4.74.** Siprofloksasinin bilyalı değirmen ile öğütülmesi sonrası elde edilen partikül büyüklükleri (ortalama \pm SS, n=6). 135
- 4.75.** Siprofloksasinin homojenizasyondan sonraki partikül büyüklüğü (d_{90}) (ortalama \pm SS, n=6). 135
- 4.76.** Malvern Mastersizer 2000 ile elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı (kırmızı çizgi-sadece siprofloksasin içeren KTİ, yeşil çizgi-siprofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ, mavi çizgi-siprofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ). 136
- 4.77.** Malvern Mastersizer 2000 ile elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı (yeşil çizgi-sadece levofloksasin içeren KTİ, kırmızı çizgi-levofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ, mavi çizgi-levofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ). 137
- 4.78.** Siprofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı (ortalama \pm SS, n=6). 137
- 4.79.** Levofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü (ortalama \pm SS, n=6). 138
- 4.80.** KTİ formülasyonları içerisindeki siprofloksasinin pH 6,4 ftalat tamponunda 1, 6 ve 24. saatlerdeki çözünürlük değerleri (ortalama \pm SS, n=3). 140

- 4.81.** Siprofloksasin içeren formülasyonların ve işlem görmemiş siprofloksasinin pH 6,4 ftalat tamponu çözünme ortamında zamana karşı % çözünen siprofloksasin miktarları (ortalama±SS, n=3). 142
- 4.82.** Levofloksasin içeren formülasyon ve işlem görmemiş levofloksasinin pH 6,4 fosfat tamponu çözünme ortamında zamana karşı % çözünen levofloksasin miktarları grafiği (ortalama±SS, n=3). 143
- 4.83.** Siprofloksasin içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif siprofloksasin değerleri (n=3). 146
- 4.84.** Sadece siprofloksasin içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen siprofloksasin yüzdesi (ortalama±SS, n=3). 148
- 4.85.** Siprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif siprofloksasin değerleri (n=3). 151
- 4.86.** Siprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen siprofloksasin yüzdesi (ortalama±SS, n=3). 153
- 4.87.** Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif siprofloksasin değerleri (n=3) 156
- 4.88.** Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen siprofloksasin yüzdesi (ortalama±SS, n=3). 158
- 4.89.** Sadece levofloksasin içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif levofloksasin değerleri (n=3). 161
- 4.90.** Sadece levofloksasin içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen levofloksasin yüzdesi (ortalama±SS, n=3). 163

- 4.91.** Levofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif levofloksasin değerleri (n=3). 166
- 4.92.** Levofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen levofloksasin yüzdesi (ortalama±SS, n=3). 168
- 4.93.** Levofloksasin dornaz alfa içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif levofloksasin değerleri (n=3). 171
- 4.94.** Levofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen levofloksasin yüzdesi (ortalama±SS, n=3). 173
- 4.95.** Calu-3 hücre hattının *inverted* mikroskop ile görüntülemesi (x10 ve x40). 175
- 4.96.** Siprofloksasin ve levofloksasin içeren KTİ formülasyonlarından antibiyotiklerin permeabilitesi (ortalama±SS; n=3) (ÇÖZ: çözelti, TOZ: toz, LCC: sıvı kaplı kültür, AIC: hava arayüzeyinde kültür) (C: Siprofloksasin KTİ, CA: Siprofloksasin-Asetilsistein KTİ, CD: Siprofloksasin-Dornaz alfa KTİ, L: Levofloksasin KTİ, LA: Levofloksasin-Asetilsistein KTİ, LD: Levofloksasin-Dornaz alfa KTİ). 177
- 4.97.** Siprofloksasin ve levofloksasin içeren KTİ formülasyonlarından antibiyotiklerin yüzde geçen miktarı (ortalama±SS; n=3) (ÇÖZ: çözelti, TOZ: toz, LCC: sıvı kaplı kültür, AIC: hava arayüzeyinde kültür) (C: Siprofloksasin KTİ, CA: Siprofloksasin-Asetilsistein KTİ, CD: siprofloksasin-Dornaz alfa KTİ, L: Levofloksasin KTİ, LA: Levofloksasin-Asetilsistein KTİ, LD: Levofloksasin-Dornaz alfa KTİ). 177

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Farmakopelerine kayıtlı ayrıştırıcı örnekleri.	31
2.2. Farklı akış koşulları için ACI ile saptanan cutoff çapları.	35
2.3. Farklı akış koşulları için Next Generation Impactor ile saptanan cutoff çapları.	39
2.4. Siprofloksasin hidroklorür monohidratın çözünürlük bilgileri.	41
2.5. Levofloksasin hemihidratın çözünürlük bilgileri.	43
3.1. Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.	52
3.2. Ön formülasyon çalışmalarında siprofloksasinin bilyalı değirmen ile öğütülme koşulları.	58
3.3. Formülasyonların teorik antibiyotik (siprofloksasin ve levofloksasin) ve mukolitik (asetilsistein ve dornaz alfa) içerikleri.	59
3.4. Püskürterek kurutma yöntemi koşulları.	61
4.1. İşlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteine ait, TGA analizi sonucunda ölçülen ağırlık kaybı değerleri (ortalama±standart sapma (SS), n=3).	83
4.2. İşlem görmemiş etkin maddelerin partikül büyüklüğü dağılımı (ortalama±SS, n=6).	94
4.3. Siprofloksasinin metanol:25 mM KH ₂ PO ₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10 µg/mL, 100 µg/mL ve 400 µg/mL derişimleri için doğruluk sonuçları (n=6).	101
4.4. Levofloksasinin metanol:25 mM KH ₂ PO ₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10 µg/mL, 100 µg/mL ve 400 µg/mL derişimleri için doğruluk sonuçları (n=6).	102
4.5. Asetilsisteinin metanol:25 mM KH ₂ PO ₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10 µg/mL, 100 µg/mL ve 400 µg/mL derişimleri için doğruluk sonuçları (n=6).	102

- 4.6.** Sipprofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10µg /mL ve 400 µg/mL derişimleri için tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6). 103
- 4.7.** Levofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10µg /mL ve 400 µg/mL derişimleri için tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6). 103
- 4.8.** Asetilsisteinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) (1:2000 oranında sodyum metabisülfite içeren) mobil faz sistemindeki 10µg/mL ve 300 µg/mL derişimleri için tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6). 104
- 4.9.** Sipprofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10µg /mL ve 400 µg/mL derişimleri için tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6). 105
- 4.10.** Levofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10µg /mL ve 400 µg/mL derişimleri için tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6). 105
- 4.11.** Asetilsisteinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) (1:2000 oranında sodyum metabisülfite içeren) mobil faz sistemindeki 10 µg /mL ve 300 µg/mL derişimleri için tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6). 106
- 4.12.** Sipprofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki dayanıklılığı (n=6). 110
- 4.13.** Levofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki dayanıklılığı (n=6). 110
- 4.14.** Asetilsisteinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki dayanıklılığı (n=6). 110
- 4.15.** Üretilen KTİ'lere ait, TGA analizi sonucunda ölçülen ağırlık kaybı değerleri. 118
- 4.16.** KTİ formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı (ortalama±SS, n=6). 136
- 4.17.** Üretilen formülasyonların teorik ve pratik ilaç içerikleri. 138

- 4.18. Sipprofloksasinin çözünme ortamı olan pH 6,4 ftalat tamponundaki çözünürlük testi sonucu (n=3). 139
- 4.19. KTİ formülasyonları içerisindeki sipprofloksasinin pH 6,4 ftalat tamponunda 1, 6 ve 24. saatlerdeki çözünürlük değerleri (ortalama±SS, n=3). 140
- 4.20. Sipprofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonlarında sipprofloksasinin zamana karşı % çözünen miktarları (ortalama±SS, n=3). 141
- 4.21. Weibul eşitliği kullanılarak elde edilen işlem görmemiş sipprofloksasin ve sipprofloksasin içeren KTİ'lerin %63,2'sinin çözünmesi için gereken süreler. 142
- 4.22. Levofloksasin içeren formülasyon ve işlem görmemiş levofloksasinin pH 6,4 fosfat tamponu çözünme ortamında zamana karşı % çözünen levofloksasin miktarları (ortalama±SS, n=3). 143
- 4.23. Sadece sipprofloksasin içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı (mg). 144
- 4.24. Sadece sipprofloksasin içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan sipprofloksasin baz miktarları (mg). 145
- 4.25. Sipprofloksasin içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları. 147
- 4.26. Sipprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı. 149
- 4.27. Sipprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan sipprofloksasin miktarları (mg). 150
- 4.28. Sipprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları. 152
- 4.29. Sipprofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı. 154

- 4.30.** Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan siprofloksasin miktarları (mg). 155
- 4.31.** Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları. 157
- 4.32.** Levofloksasin içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı. 159
- 4.33.** Sadece levofloksasin içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan levofloksasin miktarları (mg). 160
- 4.34.** Sadece levofloksasin içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları. 162
- 4.35.** Levofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı. 164
- 4.36.** Levofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan levofloksasin miktarları (mg). 165
- 4.37.** Levofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları. 167
- 4.38.** Levofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı. 169
- 4.39.** Levofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan levofloksasin miktarları (mg). 170
- 4.40.** Levofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları. 172
- 4.41.** 100 ve 500 µg/mL derişimde antibiyotik içeren formülasyonların hücre canlılık deneyi sonuçları. 174
- 4.42.** Siprofloksasin ve levofloksasinin formülasyon ve fiziksel karışım içerisinden permeabiliteleri ve % geçen miktarları. 176

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda, ilaçların uygulama yolu olarak solunum sisteminin kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır. Özellikle akciğer hastalıkları için, ilaçların solunum yoluyla uygulanması ümit verici bir yaklaşımdır. Bu nedenle, ilaçların akciğerlere lokal olarak taşınması üzerine birçok araştırma yapılmaktadır.

Kuru toz inhaler formülasyonları son yıllarda sıkça çalışılan ve birçok hastalığın tedavisinde üstünlük gösteren bir dozaj şeklidir. Hem lokal hem de sistemik amaçlarla kullanılması uygulama alanlarını genişletmektedir. Akciğerin yüzey alanının geniş ve kanlanma kapasitesinin yüksek olması dolayısıyla, inhaler formülasyonlarının sistemik amaçla kullanımı, özellikle hızlı etki istenen durumlar için uygundur. Lokal kullanımda ise, ilacın hedef bölgeye doğrudan veriliyor olması, sistemik yan etkileri azaltmakta ve hızlı etki elde edilmesini sağlamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, kistik fibrozis hastalığının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere kuru toz inhaler formülasyonları geliştirilmesi hedeflenmiştir. Kistik fibrozis, hastanın yaşam kalitesini ve süresini azaltan genetik bir hastalıktır. Bu hastalık birçok organı etkilemekle birlikte, özellikle akciğerde viskoz, dehidrate ve sağlıklı akciğer pH'sı ile karşılaştırıldığında düşük pH'ya sahip mukus yapısına neden olmaktadır. Akciğerlerdeki viskozite yükseldiği için yüzeydeki silier hareket engellenmekte ve mukusta tutulan maddeler uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca sağlıklı akciğer koşullarına oranla pH'nın düşük olması, antibakteriyel etkinliğin düşmesine neden olmaktadır. Bu koşullar da sürekli tekrarlayan ve nedeni ortadan kaldırılamayan enfeksiyonların görülmesine neden olmaktadır. Antibiyotiklerin bu koşullarda mukusa penetrasyonu zor olduğu için, inhaler formülasyonuna viskoziteyi azaltmak amacıyla mukolitik eklenmiştir. Model ilaç olarak siprofloksasin, levofloksasin antibiyotikleri ve asetilsistein, dornaz alfa mukolitikleri seçilmiştir.

Bu çalışmada öncelikli amacımız, hazırlanan formülasyonların alveollere kadar ilerleyebilmesi için 5 µm'den küçük partiküller elde etmektir. Formülasyonlar taşıyıcısız olarak formüle edilmiştir.

Bu amaçlarla:

- İstenilen partikül byklgne ulaşmak için bilyalı değirmen, homojenizatör ve püskürterek kurutma yöntemleri kombine edilmiş, 5 μm 'den küçük partikül boyutu elde etmek amacı doğrultusunda yöntem parametreleri optimize edilmiştir.
- Üretilen formülasyonların içerik tekdüzeliği, partikül byklg dağılımı tayini, DSC, TGA, XRD, FT-IR, SEM analizleri yapılmıştır.
- Üretilen formülasyonların Kütle Ortalama Aerodinamik ap, inhaler aygıtını terk eden doz (*Emitted Dose*), İnce Partikül Fraksiyonu, İnce Partikül Dozu gibi aerodinamik parametrelerini değerlendirmek amacıyla *Andersen Cascade Impactor* ile çalışmalar yapılmış, söz konusu parametreler hesaplanmıştır,
- Formülasyonların permeabilite alışmaları Calu-3 hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. Bu hücreler akciğerin silier yapısını en iyi şekilde taklit eden hücrelerdir. Calu-3 hücre hatları hem sıvıya batık hem de hava arayüzeyinde büyütülerek hazırlanmıştır. Hava arayüzeyinde büyütülen Calu-3 hücrelerinin apikal yüzeyinde mukus ürediği bilinmektedir; bu durum, formlasyonlarımızın permeabilitesi için daha gerçeğe yakın sonuçlar elde etmemizi sağlamıştır. Formülasyonlar hem çözelti olarak hem de kuru toz olarak iki üretim ortamına da uygulanmış ve antibiyotiklerin permeabilite sonuçları değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

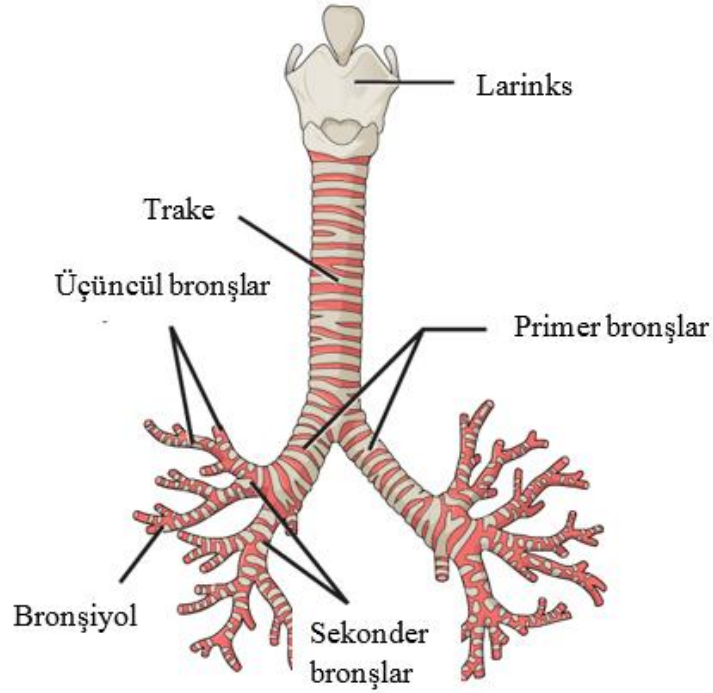
2.1. Solunum Sistemi

2.1.1. Akciğerlerin Yapısı

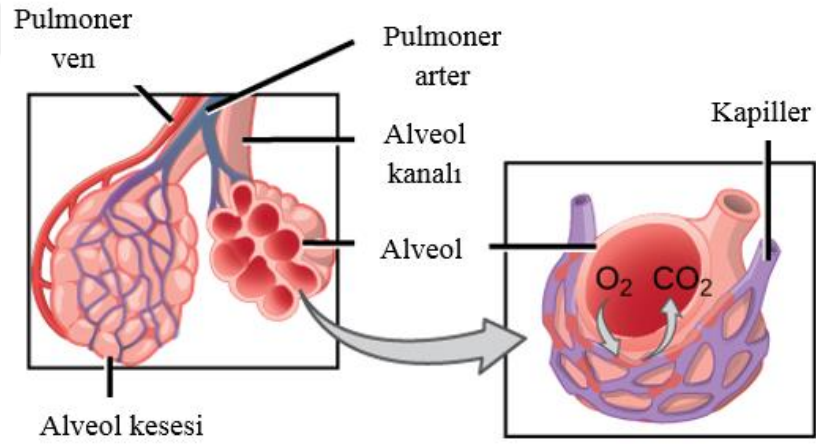
Akciğerlere ilaç hedeflendirilmesinde, akciğerlerin anatomik ve fizyolojik özelliklerinin bilinmesi, etkin tedavi için kritik öneme sahiptir.

Solunum sisteminin ana organı olan akciğerler, göğüs boşluğunda kalbin sağ ve solunda yer alan ve piramit şeklinde olan solunum organıdır. Taban kısımları diyaframın üzerinde bulunur. Göğüs çeperine bakan yüzeyleri dış bükey, kalbe bakan iç yüzeyleri ise iç bükeydir. Sağ akciğer 3, sol akciğer ise 2 adet lobdan oluşur. Bu loblar lobüllerden meydana gelir. Solunan hava, bu havanın filtrasyonundan, nemlendirilmesinden ve ısıtılmasından sorumlu olan trakeye ulaşır. Trake, bronş olarak adlandırılan iki kola ayrılmakta, bu iki bronş da solda iki ve sağda üç adet olmak üzere bronşiyolleri oluşturmaktadır (Şekil 2.1.). Bronş ve bronşiyoller dışta kıkırdak, kas ve zardan; içte ise mukozadan oluşmaktadır. Akciğerlerin toplam hacimi 4,8 L, respiratuar hacmi 3,15 L, özgül ağırlığı 0,5 g/cm³ ve hava-doku alveoler arayüzey alanı 81 m²'dir (1). Akciğerlere ait belirtilen değerler yaşa, kişiye ve cinsiyete göre değişiklik göstermektedir (2, 3).

Solunan hava, bronşiyoller aracılığıyla, lobüllerin içerisinde bulunan ve gaz difüzyonunun gerçekleştiği yapılar olan alveollere gelir (Şekil 2.2.). Alveollerin toplam yüzey alanı 48 m², alveollerde gaz alışverişini sağlayan kılcal damarların toplam yüzey alanı ise 150 m² kadardır. Yetişkin insan akciğerinde yaklaşık 300 milyon alveol bulunmaktadır. Alveollerin çapı 250-290 µm, hacmi ise 1,05x10⁻⁵ mL'dir. Akciğerlerden gaz difüzyonu gerçekleştikten sonra, karbondioksit yoğunluğu fazla olan hava dışarıya verilir. Söz konusu gaz difüzyonunun gerçekleşmesinde, alveoller de dahil olmak üzere bütün akciğer yüzeyinin nemli bir yapıya sahip olması önemli bir rol oynamaktadır. Bu nemli yapı sayesinde gazların sıvı içerisinde çözünmesi sağlanmakta ve difüzyon işlemi gerçekleşmektedir. Fakat aynı zamanda söz konusu nemli yapı, enfeksiyon oluşumu için de uygun bir ortam sağlamaktadır (4, 5).



Şekil 2.1. Bronşların yapısı (6).



Şekil 2.2. Alveollerin yapısı (6).

2.1.2. Respiratuar Bölgede Partiküllerin Tutulmasına Etki Eden Faktörler

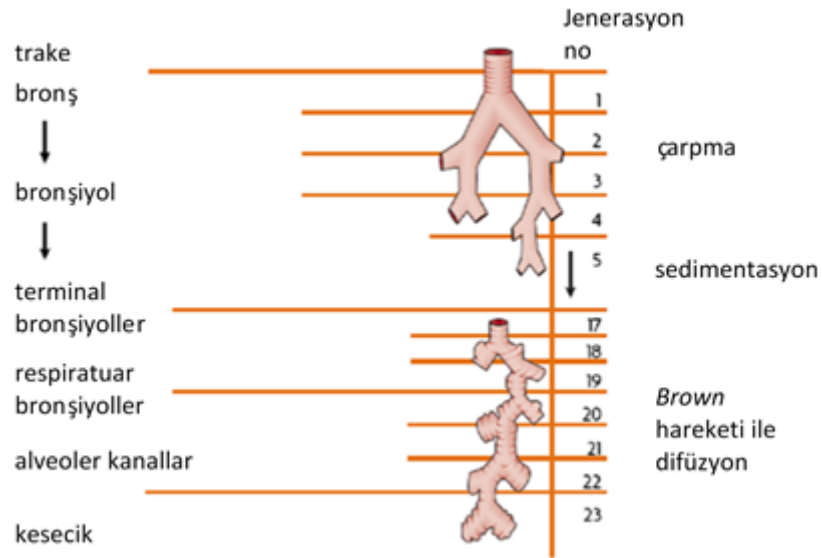
İnhalasyon yolu ile ilaç uygulanmasında, inhale edilen aerosol partiküllerinin etkili ve tekrarlanabilir akciğer tutulumu çok önemlidir. Başarılı bir inhalasyon tedavisi, ilaç etkinliğinin yanı sıra kullanılan teknolojinin etkinliği ve tekrarlanabilirliğine de bağlıdır. İlacın akciğerlere taşınmasının optimizasyonunda aerodinamik partikül davranışı (partikül büyüklüğü, yoğunluğu, higroskopisitesi,

şekli, elektrostatik özellikleri), hastanın nefes alma modeli (akış hızı, ventilasyon hacmi, nefes tutma), nefes alma siklusu içinde aerosol uygulama süresi, hastanın solunum yolu anatomisi ve morfolojisi gibi biyofiziksel parametreler etkili olmaktadır (7).

Akciğerlerde üç ana partikül tutulma mekanizması bulunmaktadır (7, 8):

- 1) Durağan çarpma ($> 5 \mu\text{m}$)
- 2) Sedimentasyon (1-5 μm)
- 3) *Brown* hareketi ile difüzyon ($<0,5 \mu\text{m}$)

Durağan çarpma, özellikle aerodinamik çapı 5 μm 'den büyük olan partiküllerin tutulmasında en etkili mekanizmadır. Sedimentasyon, periferal solunum yollarında yerçekimine bağlı olarak meydana gelmekte ve kütle ortalama aerodinamik çapı (KOAÇ) 1-5 μm aralığında olan partikülleri etkilemektedir. *Brown* hareketi ile difüzyon ise 0,5 μm ya da daha küçük partiküller için önemli bir tutulma mekanizmasıdır. Solunum sisteminin farklı bölgelerinde etkili olan partikül tutulma mekanizmaları Şekil 2.3.'te şematik olarak verilmiştir.

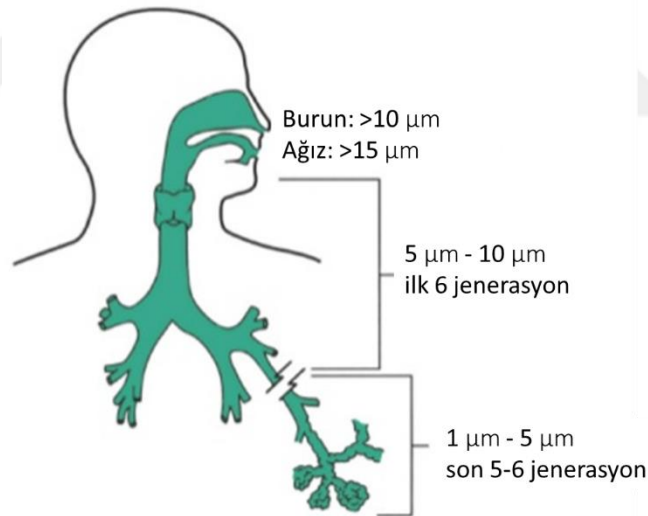


Şekil 2.3. Solunum sisteminin farklı bölgelerinde etkili olan partikül tutulma mekanizmaları (Jenerasyon no, dallanma sayısını ifade etmektedir) (9).

Aerosol partikül büyüklüğü, etkin maddenin akciğerde tutulan ve dağılan dozunun belirlenmesinde etkili en önemli parametrelerden birisidir (7).

Yaklaşık olarak 0,5 μm çapa sahip partiküllerin respiratuar bölgede tutulması minimum düzeydedir. Bu çapta tüm tutulma mekanizmaları etkisizdir. Aerodinamik partikül çapı 3 μm olduğunda maksimum alveoler tutulmaya ulaşılmaktadır. Partikül çapının artması ile bronşiyal tutulumun artması, daha az partikülün alveoler bölgeye ulaşmasına ve bunun sonucunda alveoler bölgedeki tutulumun azalmasına neden olmaktadır.

Partikül büyüklüğü 8 μm 'nin üzerine çıktığında alveoler tutulma ihmal edilmekte, bronşiyal tutulum ise maksimuma ulaşmaktadır. Aerosol partiküllerinin ağız ve boğazdaki çarpması ile, çok az partikül bronşiyal ve alveoler bölgeye ulaşabilmektedir. Özetlenecek olunursa; 1-5 μm çapa sahip partiküller esas olarak intratorasik solunum yollarında tutulurken, çapı >5 μm olan partiküller için çarpma önemli bir rol oynamakta ve ekstratorasik tutulma artarken intratorasik tutulma azalmaktadır. Şekil 2.4.'te partikül boyutuna göre solunum sisteminde tutulma bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Partikül boyutuna göre solunum sisteminde tutulma bölgeleri (10).

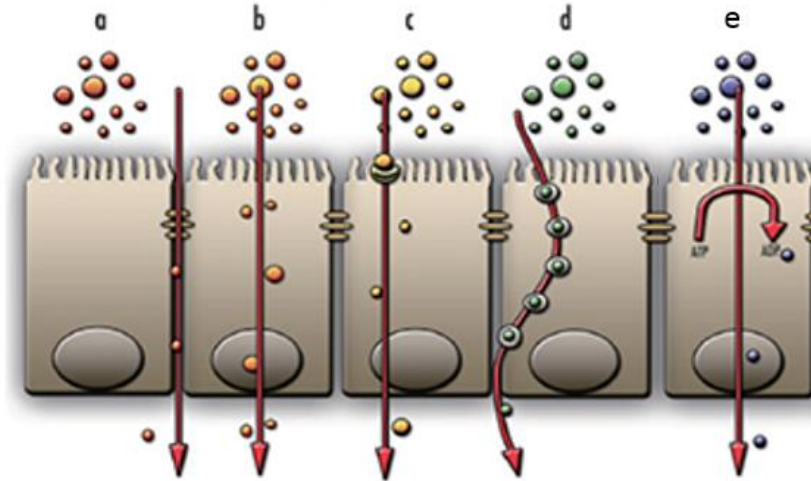
2.1.3. Pulmoner Epitelden Geçiş Yolları

Pulmoner epitel; farklı morfoloji ve fonksiyonlara sahip bronşiyal epitel ve alveoler epitel olarak ikiye ayrılır. Üst respiratuar bölgede epitel, aralarında goblet hücrelerinin bulunduğu silialı, sütun şeklindeki hücrelerden oluşmaktadır. Terminal bronşiyollerin epiteli esas olarak silialı, kübik hücrelerden ve az sayıda *Clara* hücresinden oluşmaktadır. Alveoler yüzey pulmoner sürfaktan ile kaplanmıştır.

Pulmoner sürfaktanın en ince olduğu bölgede maksimum absorpsiyon görülmektedir. Hava-kan bariyerinin kalınlığı 0,2-10 μm arasında değişmektedir. En etkili gaz değişimi, hava-kan bariyerinin kalınlığı 0,4 μm 'den az olduğunda gerçekleşmektedir (1).

Pulmoner epitelden 5 ana geçiş yolağı tanımlanmıştır (Şekil 2.5.):

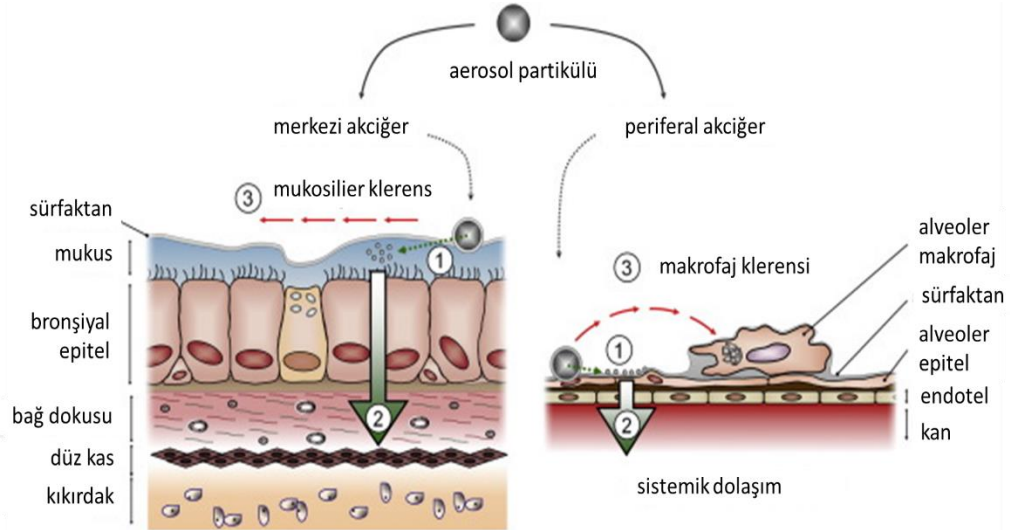
- Paraselüler difüzyon: İki hücre arasından geçişi ifade etmektedir.
- Transselüler difüzyon: Pasif, derişime bağılı bir işlemdir. Molekül hücre membranı boyunca penetre ve difüze olmalıdır.
- Bazoleteral membrandan pasif difüzyon ile sonuçlanan apikal bölgede taşıyıcı aracılı geçiş: Apikal bölgede taşıyıcı aracılı geçişi takiben bazoleteral membrandan pasif difüzyon mekanizması, birçok fizyolojik bileşen ve bazı etkin maddeler için önemli bir geçiş mekanizmasıdır.
- Transitoz: Büyük moleküller için tercih edilen bir yolaktır ve molekülün hücre membranı tarafından oluşturulan bir kese içine alınması ve daha sonra bu kesenin hücre içine alınması ile geçiş sağlanmaktadır.
- Aktif sekresyon: Adenozin trifosfat (ATP) bağımlı bir işlemdir ve bazı ilaçların pasif derişime bağılı absorptif geçişinin inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır (11).



Şekil 2.5. Pulmoner epitelden geçiş yolları (12).

2.1.4. İnhale Edilen Partiküllerin Respiratuar Bölgeden Uzaklaştırılması

Respiratuar bölgede biriken ve epitelden geçmeyen partiküller, mukosilier veya alveoler klerens mekanizmaları ile vücuttan atılmaktadır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Mukosilier ve alveoler klerens mekanizmaları (13).

Çözünmeyen partiküller, mukus tabakası içinde tutulmakta ve siliyanın hareketi ile farinkse doğru hareket etmektedir. Mukosilier hareket, fizyolojik ve çevresel faktörler ile hastalık koşullarından etkilenmektedir (14). Alveoler bölgede tutulan etkin maddeler fagositoza uğrayarak, alveoler makrofajlar tarafından uzaklaştırılabilir veya pulmoner dolaşıma absorbe olabilirler. Sağlıklı bir bireyde alveol başına yaklaşık olarak 5 makrofaj düşmektedir. Partiküllerin makrofajlar tarafından tutulması partikül büyüklüklerine bağlıdır. 6 μm çapındaki partiküller 3 μm çapındaki partiküllere kıyasla daha az fagosite olmaktadır. 0,26 μm 'den küçük çapa sahip partiküller, makrofajlar tarafından minimum düzeyde tutulmaktadır. Kaplama materyallerinin yapısı da alveoler makrofajların fagositoz hızını etkilemektedir (15, 16).

2.1.5. Akciğer Hastalıkları

Sık görülen akciğer hastalıkları pnömoni, plörezi, tüberküloz, bronşektazi, akciğer kanserleri, plevra hastalıkları, mediasten hastalıkları, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), astım, kistik fibrozis gibi çoğunlukla solunum sisteminin alt bölümleri ile ilgili hastalıklardır (17).

Astım hastalığında, solunum yolları aşırı derecede duyarlıdır ve bu durum çevresel etkenlerle solunum sisteminin daralmasına neden olmaktadır (18). KOAH, akciğerlerdeki hava yollarının daralmasına bağlı olarak soluk alıp verme sırasında hava akımının kısıtlanması ile karakterize kronik bir hastalıktır (19). Zatürre (pnömoni) bir veya birkaç akciğer lobunun iltihaplanması ile ortaya çıkan ateşli bir hastalıktır. Bronşit, akciğerlere giden havayollarının iç yüzünde bulunan zarın iltihaplanmasıdır (20).

Solunum yolu enfeksiyonları, “üst” ve “alt” olmak üzere ikiye ayrılır ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisi daha zordur. Alt solunum yolu enfeksiyonları, gelişmekte olan ülkelerde birinci, dünya genelinde üçüncü sıradaki ölüm nedenidir (21, 22). Bu enfeksiyonlarda, oral ya da parenteral uygulanan ilaçların çok düşük miktarları etki bölgesine ulaşabilmektedir; bunun nedeni ise söz konusu enfeksiyonların, akciğerlerin derinlerine yerleşmesi ve ilaçların akciğerin alt bölgelerine taşınmasının anatomik ve fizyolojik engellerden dolayı (solunum kanallarının genişliğinin değişken oluşu, mukoza temizlenmesinin çeşitli etkenlerden etkilenmesi, nefes verilmesi ile ilaç partiküllerinin solunum sisteminden atılması) sorunlu olmasıdır. Ayrıca, bu ilaçların bir kısmı ilk geçiş etkisine uğrayarak inaktif olmaktadır. Bu nedenle etki bölgesinde minimum inhibisyon derişimini (MİD) sağlamak için çok yüksek dozda ilaç uygulaması gerekmektedir (23).

Bu tez kapsamında, kistik fibrozis hastalığından kaynaklanan akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere inhaler formülasyonları geliştirmek amaçlandığı için aşağıda kistik fibrozise ilişkin bilgi sunulmuştur.

2.1.6. Kistik Fibrozis

Kistik fibrozis, gen mutasyonu (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR) ile ortaya çıkan, otozomal resesif multisistem hastalığıdır ve tekrarlayan hava yolları enfeksiyonları ile karakterize, hastanın yaşam kalitesini ve süresini azaltan genetik bir hastalıktır (24, 25). Söz konusu mutasyon, akciğerde apikal membrandaki klor kanallarının kapanmasına, buna bağlı olarak da akciğer yüzeyinde dehidrate, viskoz ve göreceli olarak düşük pH'ya sahip mukus tabakası oluşmasına neden olmaktadır. Viskozite yüksek olduğu için akciğerlerdeki silier hareket engellenmekte ve mukusta tutulan maddeler uzaklaştırılmamaktadır. Viskoz mukus

tabakası içinde tutulan makrofajlar parçalanır ve DNA'ları ortaya çıkar. Ortamdaki DNA artışı ile mukus tabakasının viskozitesi daha da artar. Bu tabakanın akışkan olmaması bakterilerin ve diğer inhale edilen maddelerin uzaklaştırılmasını engellemektedir. Etkisiz öksürme ve zayıf hava yolu klerensi, hava yolu tıkanıklığına ve nedeni ortadan kaldırılamayan, tekrarlayan enfeksiyonlara neden olmaktadır (26). Genetik hasarı düzeltmek üzere yeni ilaçlar (Kalydeco® (ivakaftor) (27), Orkambi® (lumakaftor-ivakaftor) (28); Vertex Pharms Inc.) piyasaya sunulmuştur, ancak bu hastalık süresince görülen zorlu enfeksiyonların tedavi edilmesi hastalar için hala çok önemli bir sorundur. Bu hastalarda, enfeksiyonun erken safhada yoğun antibiyotik tedavisi ile giderilmesinin, akciğer hasarını azalttığı ve beklenen yaşam süresini artırdığı gösterilmiştir (29).

Kistik fibrozis hastalığında, akciğer yüzey sıvısındaki sodyum klorür derişimi yüksek, pH ise göreceli olarak düşük olduğu için bakterisidal etki azalmıştır (30). Kistik fibrozis hastalarında, özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ile oluşan kronik bakteriyel endobronşial enfeksiyonlar gözlenmektedir (31). Bu hastalığın tedavisinde antibiyotikler oral, iv ya da inhalasyon yoluyla verilebilir. Oral yoldan verilen antibiyotiklerin, gastrointestinal yan etkilere neden olması, absorpsiyonunun değişken olması ve absorpsiyon hızının genellikle daha yavaş olması gibi sakıncaları bulunmaktadır. Oral ve iv yoldan verilen ilacın sistemik yan etkileri, akciğerlere inhalasyon yolu ile verilen ilaçlara kıyasla çok daha fazla olmaktadır (32). Piyasada kistik fibrozis hastalığından kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere, tobramisin, kolistimetat sodyum ve aztreonam çözeltilerinin nebülizer formülasyonları (33, 34), kolistimetat ve tobramisin kuru toz inhaler (KTİ) formülasyonları bulunmaktadır (35). Siprofloksasinin, bronşiektazi tedavisinde kullanılmak üzere inhalasyon için toz formülasyonu Faz 3 aşamasındadır, (Bayer HealthCare, PulmoSphere™; Novartis (36)); levofloksasinin nebülizasyon çözeltisi ise yakın zamanda EMA tarafından onaylanmıştır (Quinsair®; Raptor Pharmaceuticals) (37-40).

Tez çalışmamız kapsamında, kistik fibrozis hastalığı süresince görülen enfeksiyonları gidermek için kullanılmak üzere, antibiyotik içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Fakat antibiyotiklerin söz konusu

viskoz, dehidrate ortama nüfuz edip ilerlemesi güç olacağı için, formülasyona mukolitik eklenerek mukusun viskozitesinin azaltılması, bu sayede de antibiyotığın ilerleme kapasitesinin artırılması hedeflenmiştir. Antibiyotik olarak kistik fibroziste kullanılmakta olan siprofloksasin ve levofloksasin, mukolitik olarak da yaygın kullanımları nedeniyle asetilsistein ve dornaz alfa seçilmiştir. Her iki antibiyotik her iki mukolitikle ayrı ayrı kombine edilmiştir. Ayrıca antibiyotiklerin mukolitik içermeyen formülasyonları da ayrı ayrı hazırlanmıştır.

2.1.7. Akciğer Hastalıklarında İlaç Uygulaması

Akciğer hastalıklarının tedavisinde genellikle bronkodilatörler, antibiyotikler, mukolitikler, steroidler, antitüsitler, ekspektoranlar, sürfaktanlar ve antiastmatikler kullanılmaktadır (43).

Akciğer hastalıklarının tedavisinde inhalasyon yolu, diğer uygulama yollarına göre çeşitli üstünlüklere sahip olduğu için tercih edilmektedir. Örneğin, kapreomisin ile yapılan Faz 1 klinik çalışmasında, inhale kapreomisin en yüksek dozunun (300 mg) uygulanması ile etki bölgesinde *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı MİD üzerinde bir derişim (2 mg/L) elde edilmiş ve inhalasyon yolu ile sistemik dolaşıma ulaşan ilaç miktarı düşükken solunum yollarındaki miktar yüksek bulunmuştur (41).

Hastalığın tedavisi için klinik gerekliliklerin ve akciğer yapısı/fizyolojisinin anlaşılması, uygun taşıyıcı materyallerinin seçimi ve üretim yöntemi ölçütleri göz önünde bulundurularak kurgulanan ilaç taşıyıcı sistem tasarımı başarılı ilaç taşınmasında anahtar rol oynamaktadır.

2.1.8. Akciğer Enfeksiyonlarının Tedavisinde İnhaler Kullanımı

İnhale edilen antibiyotik formülasyonları, akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmakta ve kistik fibrozis hastalarında görüldüğü gibi genellikle kronik hava yolları enfeksiyonlarını tedavi etmeyi amaçlamaktadır (24).

Akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan tobramisin inhalasyon çözeltisine alternatif olarak, çeşitli üstünlükleri nedeniyle, bir çalışmada KTİ tobramisin üretilmiştir. KTİ tobramisinin uygulama süresi 3 dk.'dan kısa iken, tobramisin inhalasyon çözeltisinin uygulama süresi çok daha uzundur (~20 dk.). KTİ tobramisinin akciğerlerde depolanması %34 iken, tobramisin inhalasyon çözeltisinin

depolanması %5 bulunmuştur. Bu sonuçlar KTİ'lerin, inhalasyon çözeltisine göre daha iyi bir dozaj şekli olduğunu göstermektedir (42).

Bir başka çalışmada kolistinin inaktif önölacı olan kolistin metansülfonatın, iv uygulama ile % 4'ten daha az bir kısmının aktif formuna dönüştüğü gözlenmiştir (43). Etki bölgesinde MİD'e ulaşmak için yüksek dozda kolistin metansülfonatın parenteral olarak uygulanmasını takiben hastaların yaklaşık %60'ında, kolistinin yüksek dozlarına maruziyetten kaynaklanan nörotoksisite ve nefrotoksisite görülmüştür (44). Daha az sistemik maruziyet ile etki bölgesinde daha yüksek ilaç derişimine ulaşıldığı için antibiyotiklerin doğrudan hava yollarına uygulanması bu sorunun çözümü için en etkili yoldur (45). Bir farmakokinetik çalışmada kolistin metansülfonat çözeltisinin nebulizasyon ile uygulanmasını takiben kolistin sistemik dolaşıma ihmal edilebilir bir miktar geçerken ($C_{maks} < 0,3$ mg/L), balgamda ilaç derişimi yüksek dozlara ulaşmış (C_{maks} : 6 mg/L) ve uzun bir dönemde (~ 12 saat) MİD'in üzerinde bir derişim sağlanmıştır (46).

Psödomonasin neden olduğu akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle iki antibiyotik kullanılır, bunun nedeni direnç gelişimini azaltmak ve bakterisidal aktivitede sinerjik etkiyi sağlamaktır (29, 47). Klinik in vivo veriler göstermiştir ki inhale edilen antibiyotikler *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram negatif bakterilerin kolonizasyonunu azaltmaktadır (48).

Aztreonam, Faz 2 çalışmaları ile güvenilir olduğu gösterilmiş, kronik Pseudomonas enfeksiyonunun inhalasyon ile tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir (49). Tobramisin (2013) ve aztreonam (2010) çözeltilerinin nebulizerleri FDA tarafından onaylanmıştır. Nebülize kolistin metansülfonat çözeltisi sadece bazı Avrupa ülkelerinde onaylanmıştır. Amikasin ve siprofloksasin içeren diğer nebulize antibiyotikler klinik çalışma aşamasındadır. Tobramisin (Tobi® Podhaler™, 1997) ve kolistin metansülfonat (Colobreathe®, 2012) KTİ formülasyonları sırasıyla ABD'de ve Avrupa'da onay almıştır. Siprofloksasin ve vankomisin KTİ'leri geliştirme sürecindedir (33).

Akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde tek antibiyotik kullanılması, antibiyotik direncinin gelişmesine neden olabilmektedir (50). Bu nedenle, ilaç direncinin ortaya çıkmasını önlemek için farklı antibiyotikler içeren kombinasyon tedavileri klinikte

yaygın şekilde tercih edilmektedir (51). Yapılan bir çalışmada siprofloksasin ve doksisisiklin hidroklorür (1:1) birlikte püskürtülerek kurutulmuş; kombinasyonun antimikrobiyal aktivitesi *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* ve *Streptococcus pyrogenes*'ye karşı minimal iken, *E coli*'ye karşı antibakteriyel etkinin arttığı gösterilmiştir (52). Lee ve arkadaşları, siprofloksasin ve gatifloksasin hidroklorür tuzlarının püskürtülerek kurutma yöntemi ile inhaler formülasyonlarını geliştirmiş, kombinasyonun *P. aeruginosa*'ya karşı sinerjik bir antimikrobiyal etki gösterdiği belirtilmiştir (53).

Sonuç olarak, tedavi gören hastalarda akciğer fonksiyonu ve hayat kalitesinin artması ile morbidite ve hastanede yatış süresi azalmaktadır. Fakat antibiyotiklerin nebulizasyonu bronkospazm, öksürme ve hırıltılı soluma dahil çeşitli lokal iritasyonlara neden olabilmektedir. Tedavi öncesi bronkodilatör uygulanması veya ilaçların enkapsüle edildiği lipozom formlarının kullanılması yan etkilerin görülmesini ve çeşitliliğini azaltabilmektedir (33).

2.2. İnhalasyon Sistemleri

Akciğerlere hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, sistemik veya lokal etki elde etmek amacıyla geliştirilebilir. Akciğerlerin yüzey alanının geniş ve kanlanma kapasitesinin yüksek olması dolayısıyla, inhaler formülasyonlarının sistemik amaçla kullanımı, özellikle hızlı etki istenen durumlar için uygundur. Lokal kullanımda ise, ilacın hedef bölgeye doğrudan veriliyor olması, sistemik yan etkileri azaltır ve hızlı etki elde edilmesini sağlar. İlaçların solunum yoluyla uygulanması, mevcut diğer uygulama yollarına göre birçok üstünlük sağlamaktadır. Bu üstünlükler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Alt ve üst solunum yolu hastalıklarında yeterli dozda etkin madde doğrudan etki bölgesine taşınabildiği için sistemik yan etkilerin en aza indirilmesi,
- Düzenli klinik yanıt alınması,
- Oral kullanımda gözlenen ilk geçiş etkisi gibi biyolojik engellerin ortadan kalkması,
- Oral yoldan alınan etkin madde dozu ile kıyaslandığında aynı terapötik etki için çok daha düşük dozlarda kullanılabilme,

- Kötü tat, ağrı gibi hasta uyuncunu azaltan koşulların bu uygulama yolunda söz konusu olmaması,
- Küçük moleküllerden büyük peptid moleküllerine kadar birçok maddenin verilebilmesi için uygun olması,
- Geniş yüzey alanı ve yüksek geçirgenliğe sahip membran yapısı,
- Düşük enzimatik aktivite (54-63).

Akciğere ilaç hedeflendirilmesi ile yapılan tedavilerde, tedavi etkinliğini belirleyen ölçüt etki bölgesine ulaşan ilaç miktarı olduğu için hedef bölgenin belirlenmesi gerekmektedir (1, 64-69). Partikül büyüklüğü 10 μm 'nin üstündeki partiküller genellikle orofaringeal bölgede tutulurlar veya bronşiyal bölgede kalırlar ve daha zayıf sistemik etki gösterirler (70-73). Diğer yandan, partikül büyüklükleri 1 μm 'nin altında olan partiküller alveollere daha rahat ulaşırlar fakat alveollere yerleşemezler ve nefes verilmesi ile birlikte dışarı atılırlar. Literatüre göre, farklı partikül büyüklüğüne sahip inhaleler ile yapılan tedaviler, farklı terapötik yanıtlara yol açmaktadır (74). Alveollere ulaşması ve yerleşmesi istenilen partiküllerin, optimum büyüklüklerinin 2-5 μm aralığında olması gerektiği belirtilmiştir (70).

İnhale sistemlerinden beklenen özelliklerden bazıları aşağıda listelenmiştir:

- Tekrarlanabilir dozlama,
- Kimyasal ve fiziksel stabilite,
- İnhale edilen dozun kontrolü,
- Taşınabilir aygıt büyüklüğü,
- Partikül boyutunun istenen bölgeye ulaşmak için uygun büyüklükte olması (75).

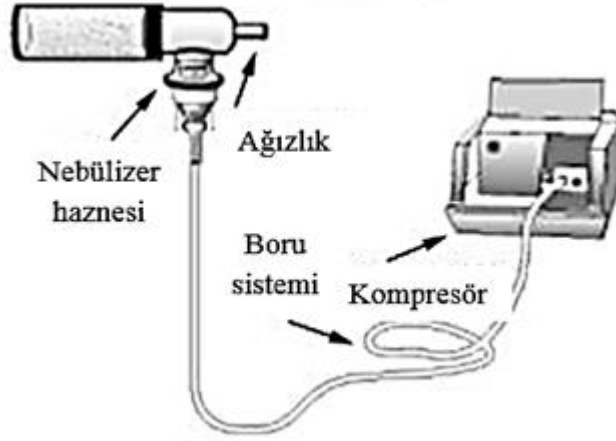
İnhale sistemleri ile yaşanan sorunlardan bazıları aşağıda listelenmiştir;

- Tek düze dozlamada yaşanan sıkıntılar,
- Akciğerlerin derinlerine yeterli miktarda ilacın ulaşmaması,
- Kullanılan püskürtücü gazların çevre ile uyumlu olmaması,
- İnhale aygıtının kullanımının zor veya maliyetli olması,
- Stabilite sorunları (76).

İnhalasyon yolu ile ilaç uygulama yöntemleri 3 ana başlık altında toplanabilir: nebulizerler, ölçülü doz inhaleler ve kuru toz inhaleler.

2.2.1. Nebülizer

Nebülizasyon yöntemi, sıvı haldeki ilaçların aerosol haline getirilip bir maske düzeneği ile ağıza püskürtülmesi yöntemidir (61, 77-80) (Şekil 2.7.).



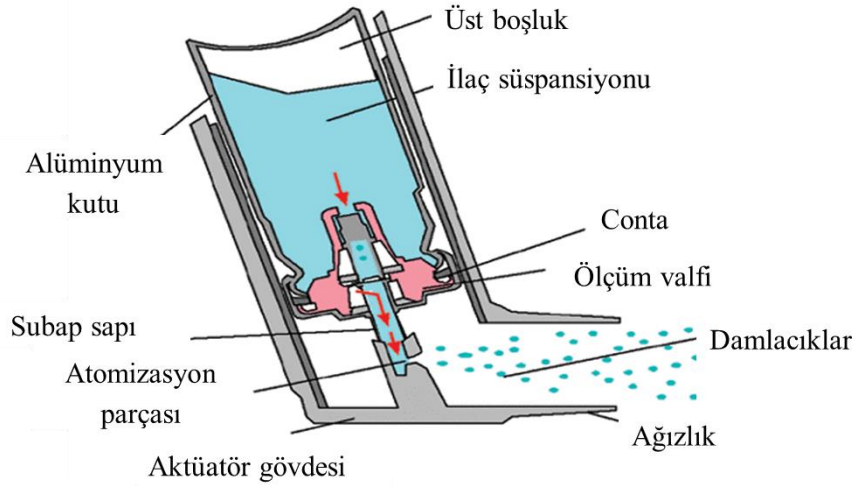
Şekil 2.7. Nebülizer sisteminin şematik gösterimi (81).

Nebülizerler, sulu çözelti veya süspansiyonları atomize etmek için tasarlanmıştır. Bu amaçla, basınçlı hava kullanılan jet nebülizerler ve yüksek frekansta ses dalgaları uygulayan ultrasonik nebülizerler bulunmaktadır (82-84).

Nebülizer performansının en zayıf noktası, uygulanan ilacın yalnızca % 1'inin hasta tarafından inhale edilmesidir (84). İnhale edilebilir damlacıkların oluşumu sırasında sıvı üzerine yüksek basınç uygulanması, özellikle proteinler gibi stabilize sorunu olan ilaçların stabilitesini etkileyebileceğinden, bir dezavantajdır. Ayrıca, nebülizer uygulanması sırasında enzim aktivitesinin azaldığı bilinmektedir (85).

2.2.2. Ölçülü Doz İnhaler

Ölçülü doz inhalerler (ÖDİ), nebülizerler ile yaşanan sorunları aşmak için geliştirilmiş taşınabilir sistemlerdir. ÖDİ'ler, sıvılaştırılmış itici gazlar ile basınç altında tutulan çözelti, süspansiyon veya emülsiyonları püskürtürken damlacık haline getiren araçlardır (86) (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. ÖDİ aygıtının şematik gösterimi (87).

ÖDİ'ler, her püskürtmede belirli dozda ilaç uygulanmasını sağlayan sistemlerdir. Aygıt içerisinde itici gazlar [kloroflorokarbon (freon), hidrofloroalkan] bulunmakta ve buna bağlı olarak ağızda soğuk freon etki ortaya çıkmaktadır. İlacın püskürtülmesiyle nefes alma eyleminin eş zamanlı yapılamaması sonucu, uygulanan ilacın ancak %3-5'i bronşiyollere ulaşmaktadır (61, 77-80).

Ara cihazlar, çocuklarda ÖDİ'lerin kullanılmasını kolaylaştırdığından tedavi edici etkinin artmasını ve yan etkilerin azalmasını sağlamaktadır (61, 77-80).

2.2.3. Kuru Toz İnhaler (KTİ)

Kuru toz inhaler (KTİ) formülasyonları son yıllarda sıkça çalışılan, birçok hastalığın tedavisinde üstünlük gösteren bir dozaj şeklidir. Hem lokal hem de sistemik amaçlarla kullanılması uygulama alanlarını genişletmektedir.

KTİ'ler etkin maddenin katı halde bulunduğu sistemlerdir. Bu durum etkin madde stabilitesi, kullanım kolaylığı ve uygulanan doz miktarı aralığı bakımından üstünlük sağlamaktadır. Etkin madde bir toz formülasyonu içinde yer aldığı için parçalanma, ayrışma ve mikrobiyolojik kontaminasyon riskleri, sıvı formülasyonlar ile karşılaştırıldığında daha azdır (88-90).

KTİ'lerin, nebulizer ve ÖDİ sistemlerine göre önemli bazı üstünlükleri vardır. Ara cihaz gerektirmediği için taşınmaları kolay, tek bir nefes ile yüksek doz inhale etmeye olanak sağladığı için tedavi süresi kısadır (91-93). En yüksek intrapulmoner depolanma, diğer inhaler formları ile kıyaslandığında KTİ ile sağlanmaktadır (61, 77-

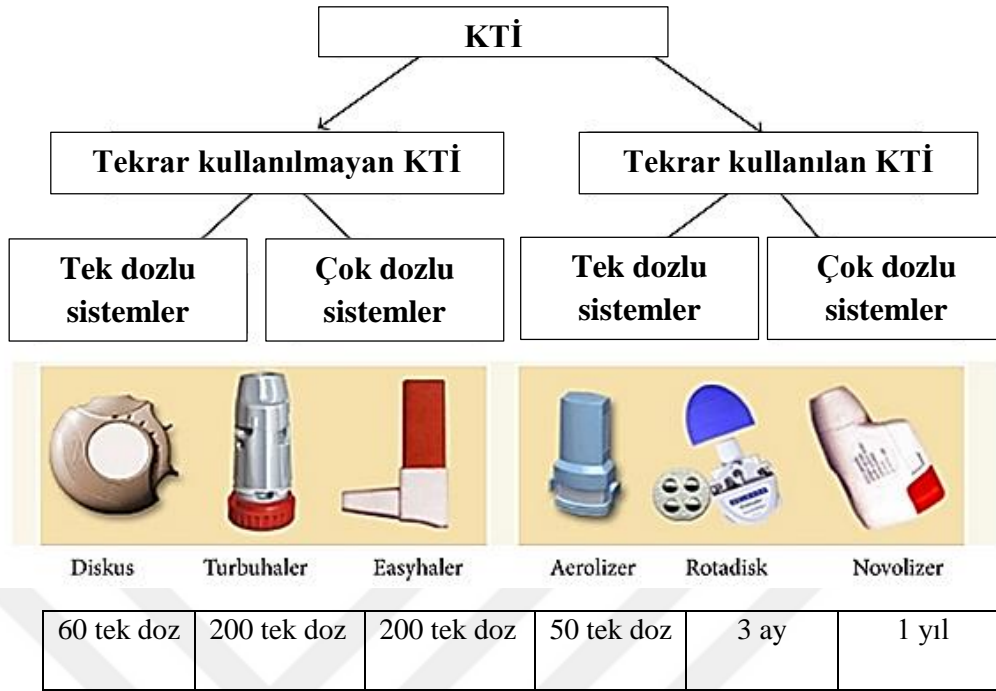
80). KTİ sistemlerinde el-ağız koordinasyonuna gerek yoktur ve itici gaz içermemektedirler (94, 95). ÖDİ'ler ile karşılaştırıldığında, KTİ ile uygulanan aynı doz ilaç, akciğere yaklaşık iki kat fazla ulaşmakta, orofarinkste biriken miktar ise daha az olmaktadır. Fakat, dozlamının inhalasyon hızından etkilendiği ve etkili bir inhalasyon için inspirasyon hızının en az 30 L/dk. olması gerektiği için (96), inhalasyonu sorunlu (örneğin KOAH) hastalarda tekdüze dozlama sağlamak zordur (97). Bu nedenlerden dolayı KTİ tozlarının akışının iyileştirilmesi oldukça önemlidir (75). Ayrıca KTİ'lerde yüksek nemde fiziksel olarak stabilite sorunu gözlenebilmektedir.

İleri partikül mühendisliği teknikleri ve akıllı aygıt tasarımları, KTİ antibiyotiklerin performansını artırmıştır. Fakat yüksek dozda verilen antibiyotiklerin öksürük ve boğaz iritasyonu gibi yan etkileri gözlenmektedir.

KTİ formülasyonunda klinik yanıtı uygunluk açısından ve farmasötik teknoloji yönünden üzerinde önemle durulması gereken konuların başında partikül büyüklüğü gelmektedir. Bunun yanında partikül şekilleri, dansiteleri ve yükleri de önemlidir. Ayrıca etkin maddenin çözünürlüğü, partiyon katsayısı, permeabilitesi, molekül ağırlığı, enzimatik stabilitesi gibi fizikokimyasal özellikleri ve formülasyon şekli de inhale edilen ilacın biyoyararlanımını etkilemektedir.

Kuru Toz İnhaler Aygıtları

KTİ'ler tek dozluk veya çok dozluk sistemler olarak sınıflandırılabilirler. KTİ sistemlerinde toz formülasyonu, bir kapsül veya çok dozlu blisterlere doldurularak çeşitli tasarımlara sahip aygıtlara yerleştirilir (98). Turbuhaler[®], Spinhaler[®], Rotahaler[®], Aerolizer[®], Diskhaler[®] ve Diskus[®] gibi KTİ aygıtları yaygın olarak kullanılmaktadır (82). KTİ aygıtlarının sınıflandırılması ve aygıt örnekleri Şekil 2.9.'da verilmiştir.



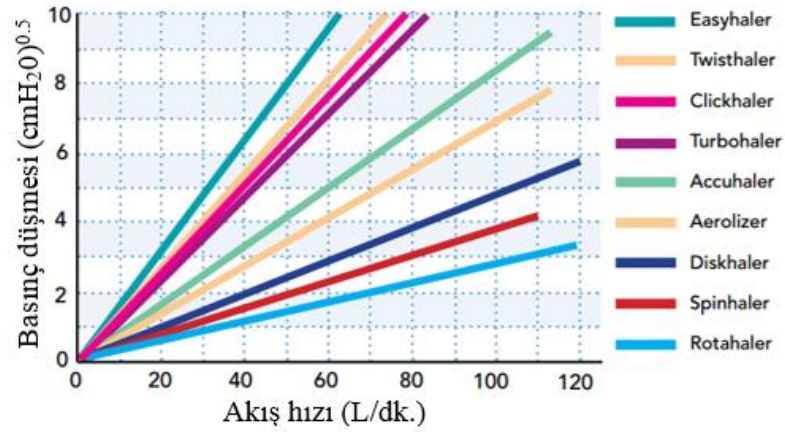
Şekil 2.9. KTİ aygıtlarının sınıflandırılması ve aygıt örnekleri (99).

Kuvvetsiz bir inhalasyonla bile yüksek miktarda maddenin inhale edilebilmesini sağlamak amacıyla, inhaler aygıtlarının direncini düşürmek hedeflenmiştir ve bu amaçla çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca kapsülde kalan toz miktarını azaltmak yani akciğere ulaşan dozu artırmak için birçok farklı kapsül ve blister delme ve açma mekanizması geliştirilmiştir. Çalışmamızda, aerosolizasyon direnci düşük olan Aerolizer® aygıtı kullanılmıştır (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Aerolizer® aygıtının parçaları (100).

Farklı akış hızı koşullarında, gözlenen basınç düşmesi ölçütü, kullanılan inhaler aygıtına göre değişkenlik göstermektedir (Şekil 2.11.) (101).



Şekil 2.11. Farklı inhaler aygıtlarından elde edilen akış hızına karşı basınç düşmesi grafiği (101).

Kuru Toz İnhalelerinde Kullanılan Yardımcı Maddeler

İnhalasyon tedavisinde kullanılan ilaçların homojen karışmasını sağlamak, kapsül ve blisterlere çok küçük dozların dolumunu sağlamak, toz akışını iyileştirmek ve ilacın inhalasyon boyunca dağılıbilirliğini sağlamak amacıyla, inhaler formülasyonlarında çeşitli yardımcı maddeler kullanılmaktadır.

İnhalasyon sistemlerinde kullanılacak olan etkin madde partiküllerinin uygun büyüklüğe getirilmesi için genellikle mikronizasyon işlemi uygulanmaktadır. Mikronizasyon işlemi ise statik, kohezif ve adhezif yapıları nedeniyle zayıf akış özelliğine sahip partiküllerin oluşumuna neden olmaktadır. Zayıf akış özelliğine sahip etkin madde partiküllerinin akış özelliklerini düzeltmek için genel olarak büyük taşıyıcı partiküller kullanılmaktadır (102).

Düşük toksisitesi, düşük nem düzeyi ve düşük maliyeti ile inhalerlerde en çok tercih edilen taşıyıcı laktozdur. Laktoz inert bir yardımcı maddedir ve pulmoner yolla kullanım için FDA'dan onay almıştır (75, 103-106). Etkin madde veya maddelerin, daha büyük partikül büyüklüğüne sahip olan laktozun olası bağlanma bölgelerine bağlanması ile akış iyileştirilir (75). Bununla birlikte glikoz, mannitol gibi polioller, veya trehaloz, sükroz, rafinoz gibi kristal şekerler de alternatif taşıyıcılar olarak kullanılabilir (107).

Bilindiği üzere partiküllerin alveollere ulaşabilmesi için aerodinamik çaplarının 1-5 µm olması gerekmektedir. İnhalasyon sırasında, etkin maddenin aerosolize olabilmesi için, etkin madde ve taşıyıcı partikülleri arasında var olan adhezif kuvvetin veya etkin madde partikülleri arasındaki kohezif kuvvetin yenilmesi

gerekmektedir. Taşıyıcı maddenin ve üretim yönteminin seçilmesi aşamasında bu hususların göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Taşıyıcıların yanısıra kuvvet kontrol ajanları da KTİ formülasyonlarında kullanılabilir. Yapılan çalışmalar, kuvvet kontrol ajanları (Mg stearat veya Na stearat gibi) ile kohesif partikül yüzeylerinin kaplanmasının, toz akışını ve aerosolizasyonunu artırabildiğini göstermiştir (108, 109). Mg stearat için, FDA tarafından (Foradil® Certihaler®, BREO® ELLIPTA™ ve ANORO™ ELLIPTA™) inhalasyon preparatlarında kullanılmak üzere onay verilmiştir. Mg stearatın, öğütülmüş ilaç partikülleri üzerine ince bir tabaka şeklinde kaplanması, kohesiv özellikte önemli bir azalma sağlamaktadır (108-111). Püskürterek kurutma ile üretilen, % 1 (a/a) Na stearat ile kaplanmış tobramisin tozlarının ince partikül fraksiyonu % $84,3 \pm 2,0$ iken, tek başına püskürtülerek kurutulmuş tobramisinin % $27,1 \pm 1,9$ olarak bulunmuştur (Analiz, Aerolizer® aygıtı ile 60 L/dk. akış hızında yapılmıştır) (112). Bu da Na stearatın, aerosolizasyonu anlamlı derecede artırdığını göstermektedir. Kaplama için kullanılacak yardımcı madde seçimi kritiktir. Örneğin, Belotti ve ark. yaptıkları çalışmada, püskürtülerek kurutulmuş amikasinin yüzeyinin PEG-32 stearat ile kaplanmasının, ince partikül dozunu düşüğünü göstermiştir (113).

Aerosolizasyon performansını iyileştirmek için dispersiyon artırıcılar kullanılabilir. Bu amaçla en çok kullanılan yardımcı madde lösindir ve genellikle püskürterek kurutma yönteminde besleme çözeltisine veya süspansiyonuna eklenir (114, 115). Lösünün oluşturduğu, püskürtülerek kurutulmuş partiküllerin dış yüzeyindeki pürüzlü çeper veya kaplama ile, düşük yüzey enerjisine sahip partiküller elde edilmektedir. Lösün ile birlikte püskürterek kurutma ile elde edilen partiküller, poröz veya içi boş olduğundan, dansiteleri düşüktür. Bu durumda, hacmi büyük olduğu için akışı iyi, aerodinamik çapı yeterince küçük olduğu için de etki bölgesine ulaşma yeteneği yüksek partiküller elde edilir (116-118).

Akciğerlerde spesifik bölgelere hedeflendirilmiş etkin maddelerin biyoyararlanımlarını iyileştirmek ve salımlarını optimize etmek için lipozom, nanopartikül, mikropartikül, siklodekstrin kompleksleri, misel ve mikroemülsiyon formlarındaki ilaç taşıyıcı sistemlerden yararlanılmaktadır.

Lipozomal Kuru Toz İnhalerler

Prolipozomlar vücutta uygulama öncesi veya sonrası su ile temas ettiğinde lipozom oluşturabilen kuru tozlardır (119, 120). Lipozomlar pulmoner surfaktanın yapısında bulunan fosfolipitler ile hazırlandıkları için biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik olmayan yapılardır. Lipozomlar ile hem hidrofilik hem de lipofilik etkin maddeler taşınabilmektedir. Sitotoksik ajanlar, antiastmatik, antimikrobiyal ve antiviral etkin maddeler ve sistemik etkili antioksidanlar lipozomlara yüklenebilmektedir. Rojanarat ve ark. tarafından püskürtülerek kurutulmuş izoniazid prolipozomu geliştirilmiş, fakat partikül aglomerasyonundan dolayı düşük bir ince partikül fraksiyonu elde edilmiştir (%15-35) (121). Başka bir çalışma göstermiştir ki püskürterek kurutma ile üretilen rifapentinin soya fosfatidilkolin prolipozomları, düşük etkinlikli Rotahaler® aygıtı ile 60 L/dk. akış hızında test edildiğinde iyi bir aerosolizasyon performansı ($1,56 \pm 0,16$ µm aerodinamik çap ve $92,5 \pm 1,5$ ince partikül fraksiyonu) elde edilmektedir (122). Bu çalışmalar ile prolipozom materyallerinin seçiminin sadece ilaç salım profilini değil aynı zamanda aerosolizasyon performansını da etkilediği gösterilmiştir.

Polimerik formülasyonlar

Suda çözünen inhale edilebilir ilaçların hızlı salım özelliklerini modifiye etmek için geliştirilen bir formdur. Biyolojik olarak uyumlu olan, in vitro ve in vivo çalışmalarda düşük toksisite gösteren polivinil alkol (PVA) ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerleri sürekli salım ajanları olarak sıklıkla kullanılmaktadır (123-125). Ancak uzun vadede pulmoner inflamasyonu ve/veya fibrozu tetikleyebileceğinden, bu polimerlerin akciğerlere sürekli teması bir endişe kaynağıdır (126). Ayrıca, akciğerdeki yabancı partiküller ya mukosilyer temizleme ya da makrofaj alımı ile uzaklaştırılacağından, polimerik partiküller ile elde edilen örneğin uzatılmış ilaç salımı, in vivo koşullarda mümkün görülmemektedir. Bu nedenlerle, inhale edilebilir polimerik formülasyonların güvenilirliği ve etkinliği ile ilgili in vivo ve klinik araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Literatürde siprofloksasin, doksisisiklin, levofloksasin, tobramisin, rifampisin gibi antibiyotiklerin, PVA, poli (kaprolakton), polilaktid (PLA), PLGA gibi polimerlerle, emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma, püskürterek kurutma gibi

yöntemlerle sürekli salım sağlayan inhale edilebilir polimerik formülasyonları hazırlanmıştır (127-135).

Nanopartikül Kuru Toz İnhaleler

Nanopartiküller, KTİ olarak pulmoner yolla uygulanabilir (136), ancak nanopartiküllerin küçük partikül büyüklükleri (10-1000 nm) akciğerde birikmeye uygun değildir ve nanopartiküllerin verilen nefes ile solunum sisteminden uzaklaştırılmaları söz konusudur. Bu sorun, nanopartiküllerin, püskürtülerek kurutulması (137-139) veya manitol (138, 140), PVA veya lösin ile püskürterek dondurularak kurutulması (140, 141) yoluyla solunabilir mikroagregatlar elde edilmesi veya laktoz gibi taşıyıcı partiküller ile birlikte uygulanması ile giderilebilmektedir (142).

Nanopartiküler sistemlerde etkin maddenin polimerin içinde hapsedilebilmesi, enzimatik parçalanmaya karşı koruma sağlar, bu durum da ilacın biyoyararlanımının artmasına neden olur. Ayrıca suda çözünmeyen ilaçların çözünürlüğünü iyileştirdiği ve mukosilyer klerensi azalttığı için, inhale edilebilir nanopartikül formülasyonları tercih edilmektedir (143).

Nanopartiküller; tüm bu özelliklerinin yanı sıra hedef bölgelere seçici olarak gönderilebilmeleri nedeniyle, özellikle tümörlere karşı kullanılmak üzere umut veren sistemlerdir (136, 144). Yapılan çalışmalar polimerik nanopartiküllerin lipozomlardan daha stabil olduğunu göstermiştir (136) fakat inhale edilebilir nanopartiküllerde toksisite sorunu dikkat edilmesi gereken bir konudur.

Literatürde amikasin, siprofloksasin, tobramisin, vankomisin gibi antibiyotiklerin, çözücü difüzyon tekniği, dondurarak kurutma, yüksek basınçlı homojenizasyon gibi yöntemlerle inhale edilebilir nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır (145-151).

Katı Lipit Nanopartikül Kuru Toz İnhaleler

Katı lipit nanopartiküller (SLN); emülsiyonlar, lipozomlar gibi klasik kolloidal sistemlere alternatif olarak geliştirilmiştir. SLN'ler ile büyük çaplı üretim mümkündür. Yapılan çalışmalarda prednizolon, diazepam, kamptotesin gibi etkin maddeler

SLN'lere yüklenebilmektedir. SLN'ler, ortalama partikül büyüklüklerinde önemli bir değişiklik meydana gelmeksizin nebulize edilerek veya toz haldeki SLN'nin kuru toz inhalasyonu ile pulmoner yolla uygulanabilmektedir (152).

Siklodekstrin İçeren Kuru Toz İnhalerler

Siklodekstrinler (CD); siklik oligosakkaritlerdir. Hidroksil grupları taşıyan CD'nin dış kısmı hidrofilik, içteki boşluk ise lipofildir. Etkin maddeler CD'lere inklüzyon kompleksi oluşturarak bağlanmaktadır. β -CD kavite büyüklüğü, etkin madde:kompleks oluşturma etkinliği ve ucuz olması nedeniyle ilaç endüstrisinde en çok kullanılan CD'dir (153). CD'ler etkin maddeyi enzimatik degradasyondan koruyarak ve sürekli salımını sağlayarak, ilacın biyoyaralanımını artırmakta ve istenen salım profillerinin elde edilmesine olanak tanımaktadır. (154).

Mikropartiküler Kuru Toz İnhalerler

Mikropartiküller 1-999 μ m partikül büyüklüğüne sahip, hidrofilik ve lipofilik ilaçlar ile hazırlanabilen, mikrokapsül veya mikroküre sistemleridir. Etkin madde partikül içinde enkapsüle edilebilir ve partikül içindeki etkin madde katı, çözelti, süspansiyon veya emülsiyon şeklinde bulunabilir. Mikropartiküller işlem ölçütleri değiştirilerek istenen büyüklük, şekil ve porozitede hazırlanabilmektedir. Alveoler makrofajlara hedeflendirilmek üzere pulmoner yol ile uygulanan mikropartiküller, tüberküloz gibi hastalıkların tedavisinde etkin maddenin hücrelere yüksek miktarının taşınmasında üstünlük sağlamaktadır. Diğer hastalıkların tedavisinde ise pulmoner uzaklaştırmayı önlemek ve böylece etkin maddenin alveoler yarı ömrü ve biyoyaralanımını artırmak için alveoler makrofajlardan kaçınılması gerekmektedir.

İnhaler olarak uygulanmak üzere birçok mikropartikül hazırlama yöntemi bulunmaktadır.

Taşıyıcısız Kuru Toz İnhalerler

Daha önce de belirtildiği gibi, mikronize ilaçların akışını ve aerosolizasyon özelliklerini iyileştirmek için, inhaler formülasyonlarına yardımcı maddeler dahil edilebilmektedir. Bununla birlikte, inhalasyon için uygun yardımcı maddeler oldukça sınırlıdır. Dahası, formülasyona yüksek miktarda yardımcı madde eklenmesi, uygulanan tozdaki etkin madde miktarını azaltır. Günümüzde KTI'lerle ancak

mikrogram düzeyinde ilaç uygulanabilmektedir. Diğer KTİ'lerle karşılaştırıldığında antibiyotiklerin hedeflenen terapötik etki için gerekli miktarları oldukça yüksek olduğundan (MİD'leri göz önünde bulundurulduğunda) ve taşıyıcı ilavesi toz hacmini çok artıracığı için, antibiyotikler ile taşıyıcıları kombine etmek hemen hemen mümkün değildir. Dolayısıyla, mikronize ilacın akışını iyileştirmek için taşıyıcıya ihtiyaç duymayan formülasyonlar ile ilgili çalışmalar artmıştır. Pulmicort® (budesonid) ve Bricanyl® (terbutalin) KTİ'leri gibi bazı piyasa preparatları, düşük miktarda ilaç içermelerine rağmen taşıyıcısız olarak formüle edilmiştir. Benzer şekilde tobramisin antibiyotiği de taşıyıcısız olarak formüle edilmiştir (155).

Taşıyıcı içermeyen formülasyonlar, sistemik dolaşıma geçen miktarı azaltmak ve etki bölgesine yüksek dozda antibiyotik ulaştırmak için ideal sistemlerdir. Bu tez kapsamında, yüksek dozlarda uygulanan siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotikleri kullanıldığı için, formülasyonlar taşıyıcısız olarak üretilmiştir (155).

2.3. Kuru Toz İnhaler Formülasyonların Üretimi

Akciğerde depolanma için 1-5 µm aerodinamik çap optimumdur. Bu boyuta ulaşmak amacıyla öğütme yöntemleri farmasötik endüstri için uygun hale getirilmiştir. Fakat öğütülmüş tozlar yüksek yüzey enerjisine sahip oldukları için kohesif özellik gösterebilir (104).

İnhalasyon için kuru toz formülasyonu geliştirme sürecinde 4 ana strateji izlenebilir:

1. Küçük taşıyıcı ile serbest ilaç partiküllerinin kombinasyonu,
2. Küçük ilaç ile büyük taşıyıcı partiküllerinin kombinasyonu,
3. Büyük poröz ilaç partikülleri üretimi,
4. Taşıyıcı partiküller içinde enkapsüle edilmiş nanopartikül ilaçların üretimi.

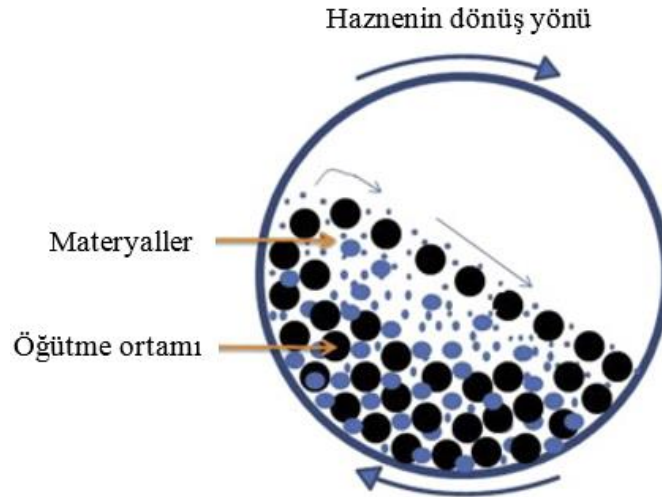
Toz akışını iyileştirmek için, genelde astım ve KOAH tedavisinde kullanılan düşük doz ilaçlara büyük partiküllü taşıyıcılar eklenmektedir. Fakat bu yaklaşım toz hacmini artıracığından yüksek dozlu antibiyotikler için tercih edilememektedir. Bu nedenle partikül mühendisliği, akış ve aerosolizasyon özellikleri iyi, taşıyıcısız inhale edilebilir antibiyotik tozlarının üretimi için etkili bir çözümdür (143, 156).

Taşıyıcısız inhalerler, çözücü ekstraksiyon/buharlaştırma, faz ayrışması (koaservasyon), jet öğütme, süperkritik sıvı, bilyalı değirmen, yüksek basınçlı homojenizasyon, püskürterek kurutma ve püskürterek dondurarak kurutma yöntemleri ve bu yöntemlerin modifiye ve/veya kombine edilmesi ile üretilmektedir (155, 157-160). Bu tez çalışması kapsamında bilyalı değirmen, yüksek basınçlı homojenizasyon ve püskürterek kurutma yöntemlerinin kombinasyonu ile tek başına püskürterek kurutma yöntemi partikül mühendisliği kapsamında partikülleri tasarlamak amacıyla uygulanmıştır.

2.3.1. Bilyalı Değirmen Yöntemi

Bilyalı değirmen, partiküllerin kuru olarak veya süspansiyon içindeyken öğütülmesini ve homojen partiküller elde edilmesini sağlayan mekanik bir mikronizasyon yöntemidir. Bu yöntemde çeşitli malzemelerden yapılmış (seramik, agat, paslanmaz çelik gibi), farklı boyutlarda bilyalar kullanılmaktadır. Seçilen bilyalar öğütülecek kuru toz veya süspansiyon ile birlikte cihazın haznesine yerleştirilmektedir. Cihaz çalıştırıldığında hazne, istenen hızda (rpm) ve sürede dönmekte, buna bağlı olarak da hazne içindeki bilyalar hareket etmektedir. Hazne duvarı ile bilyalar arasında veya iki bilya arasında sıkışan partiküller öğütülmektedir. Dönüş hızı ve işlem süresi başta olmak üzere; bilyaların sayısı, büyüklüğü, öğütülen toz miktarı veya süspansiyon miktarı, süspansiyonun katı içeriği gibi parametreler elde edilecek partikül özelliklerini etkilemektedir. Bilyalı değirmen yöntemi, sürtünme ile öğütme esasına dayandığı için işlem sırasında ısı açığa çıkabilmekte; bu durum, öğütülen maddelerin stabilitesi üzerinde olumsuz etkilere yol açabilmektedir (143).

Bilyalı değirmen yönteminde, parametreler optimize edilerek maddelerin kristal yapısı da değiştirilebilmektedir. Kristal yapıdan amorf yapıya geçiş, maddelerin çözünürlüğünü, higroskopik özelliklerini ve stabilitesini etkilemektedir. Bu nedenle elde edilen partiküllerin partikül boyutlarının yanı sıra kristal yapıları da incelenmelidir. Bu yöntem ile karbamazepin, indometazin, danazol gibi etkin maddelerin öğütüldüğü bilinmektedir. Bilyalı değirmen cihazının şematik gösterimi Şekil 2.12.'de verilmiştir (161).



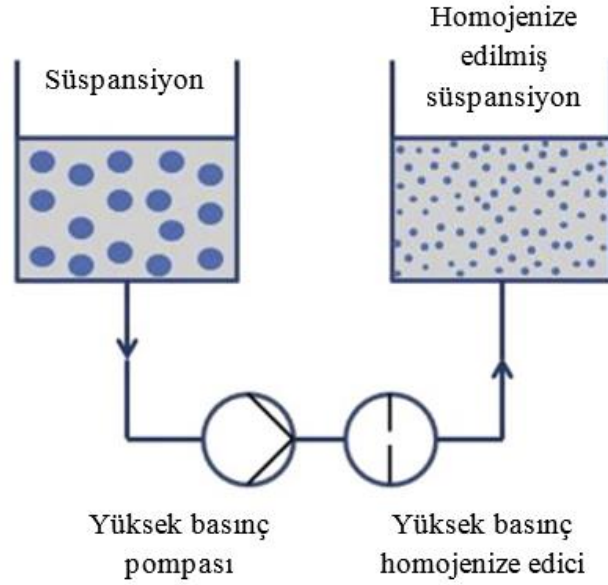
Şekil 2.12. Bilyalı değirmen cihazının şematik gösterimi (161).

Tez kapsamında, işlem görmemiş maddelerin ön öğütme işlemleri bu yöntem ile yapılmıştır.

2.3.2. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyon, nanosüspansiyon elde etmek için sıklıkla kullanılan bir yukarıdan aşağıya mekanik öğütme yöntemidir. Prednizolon, karbamazepin, nifedipin, budesonid gibi etkin maddelerin bu yöntem ile öğütüldüğü çalışmalar mevcuttur. Bu yöntemle öğütülmek istenen materyal, çözünmediği bir sıvı içerisinde disperse edilir. Elde edilen dispersiyon cihazın haznesine yerleştirilir. Cihaz istenen basınçta çalıştırılır. Cihazın uyguladığı basınç ile, belirli por çaplarına sahip *chamber*'dan geçen dispersiyon içerisindeki partiküllerin küçülmesi sağlanır. İstenen partikül büyüklüğü elde edilene kadar bu işlem tekrar edilir. Cihazın uyguladığı basınç ve işlem tekrar sayısı başta olmak üzere; başlangıç partikül büyüklüğü, dispersiyonun katı içeriği, materyalin parçalanması için gerekli enerji miktarı gibi parametreler, elde edilen partikülün büyüklüğünü etkilemektedir (143, 161).

Cihaz, yüksek basınç uygulayarak çalıştığı için, işlem esnasında yüksek miktarda ısı açığa çıkmaktadır. Isı ile bozulan materyal ile çalışılırken bu durum göz önünde bulundurulmalı ve sistemi dışarıdan soğutmak gibi önlemler alınmalıdır. Yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminin şematik gösterimi Şekil 2.13.'te verilmiştir (161).

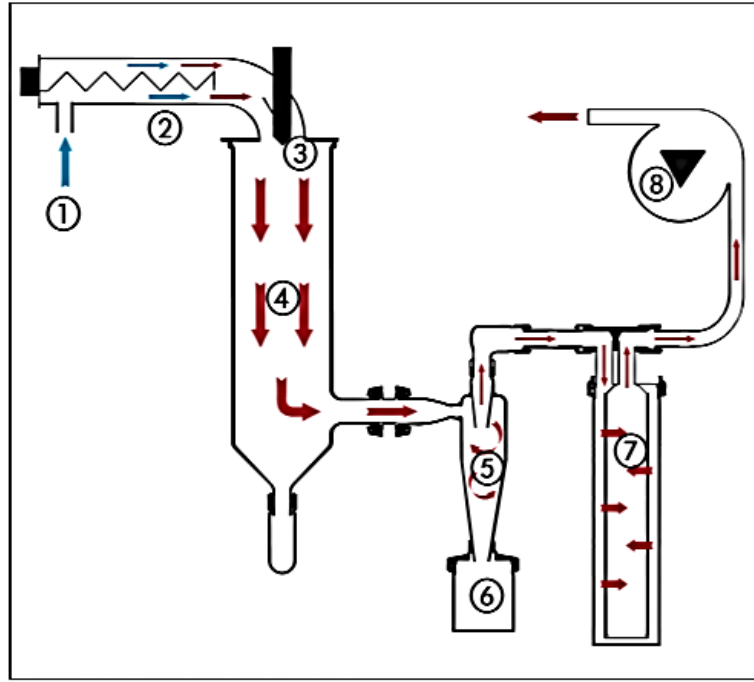


Şekil 2.13. Yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminin şematik gösterimi (161).

Tez kapsamında, bu yöntem ile süspansiyonlar hazırlanmış ve hazırlanan süspansiyonlar püskürtülerek kurutulmuştur.

2.3.3. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma yöntemi, oldukça hızlı, kullanışlı ve büyük çaplı üretim için uygun bir partikül mühendisliği tekniğidir (162, 163). Bu yöntem ile hazırlanan formülasyonların akciğerlere doğrudan uygulanması mümkündür. Yöntem, inhale insülin (Exubera[®], Pfizer), tobramisin (Tobi[®], Novartis) ve mannitol (Aridol[®], Pharmaxis) üretiminde kullanılmıştır. Püskürterek kurutma işlemi için kullanılan çeşitli püskürterek kurutma cihazları olmakla birlikte (Buchi Nano Spray Dryer B-90, Mini Spray Dryer B-190, Mini Spray Dryer B-191, Mini Spray Dryer B-290 (164-172)), bu tez kapsamında mikronaltı boyutta partikül elde etmeyi sağlayan Büchi Mini Spray Dryer B-290 cihazı kullanılmış, cihazın şematik gösterimi Şekil 2.14.'te verilmiştir. Literatürde bu yönetime ilişkin; budesonid, beklometazon dipropiyonat, itrakonazol, flutikazon propiyonat, sislesonid, levofloksasin, salbutamol sülfat, sükröz, α -laktöz gibi maddeler ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (137, 143).



Şekil 2.14. Büchi Mini Spray Dryer B-290 cihazının şematik gösterimi (1. Püskürtme gazı, 2. Isıtıcı, 3. Ağızlık, 4. Kurutma haznesi, 5. Siklon, 6. Toplama kabı, 7. Çıkış filtresi, 8. Aspiratör) (173).

Püskürtülerek kurutulmuş küresel, poröz ve iyi akış gösteren partiküller, üretim ve dispersiyon aşamasına yardım ederek taşıyıcıya ihtiyacı azaltmakta, bu özelliği ile de taşıyıcısız KTİ üretimi için en çok tercih edilen yöntem olmaktadır.

Bu yöntem ile büyük poröz ilaç partikülleri hazırlamak mümkündür. Büyük partikül boyutları sayesinde poröz partiküller daha iyi akışa sahiptir ayrıca akciğerlerde fagositik klerens mekanizmasından da kaçabilirler (174). Büyük partiküllerin agregasyon eğilimleri düşük, dağılma kapasiteleri yüksektir.

Püskürterek kurutma yönteminde, elde edilen kuru tozun partikül büyüklüğü yöntem parametreleri ile kontrol edilebilmektedir (175). Kullanılan çözücünün kaynama noktası, buhar basıncı ve ilaç-çözücü ilgisi gibi etkenler sonuçta elde edilen partiküllerin performansı üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Ayrıca besleme çözeltisinin, süspansiyonunun veya emülsiyonunun derişimi, giriş sıcaklığı, pompa hızı, hava akış hızı gibi yöntem ölçütleri de partikül özelliklerini etkilemektedir. Püskürterek kurutma işlemi esnasında, mikropartiküllerin siklon ayırıcının duvarlarına yapışması ve/veya toplama kabına girmeden filtreden geçerek tutulması nedeniyle önemli miktarda madde kaybı meydana gelebilmekte, bu durum da verimi

düşürmektedir. Bu sorunu aşmak için, antiadherent olarak mannitol kullanılmaktadır (176). Püskürterek kurutma yönteminin diğer bir sakıncası ise ısıya duyarlı etkin maddeler ve özellikle proteinler için stabilite sorunlarına neden olma riski taşımasıdır (177).

Püskürterek kurutma işlemi ile üretilen amorf veya kısmen amorf ilaçlar için stabilite sorunu söz konusu olabilmektedir (178-180), bu nedenle püskürtülerek kurutulan ilaçların fiziksel ve kimyasal stabiliteleri kritiktir.

Adi ve ark. göstermiştir ki püskürtülerek kurutulmuş siprofloksasin amorfudur ve %50 bağıl neme maruz kaldığında %7,9'a kadar nem çekmektedir. %70 bağıl nemde gerçekleşen yeniden kristalleşme, nem nedeniyle stabilitenin bozulması olarak değerlendirilmiştir. %50 (a/a) manitol ile birlikte püskürtülerek kurutulan siprofloksasin tozlarında higroskopik özellik azalmış ve amorf siprofloksasinin yeniden kristallenmesi önlemiştir (181). Fakat burada %50 oranında yardımcı madde eklenmesi inhalasyon için gerekli toplam miktarın önemli derecede artmasına neden olacaktır.

Zhou ve ark., püskürterek kurutma yöntemi ile taşıyıcısız olarak ürettikleri kolistin tozlarını, 100 L/dk. akış hızında Aerolizer® aygıtı ile analiz etmiş, ince partikül fraksiyonunu %80 olarak belirlemiştir (182). Elde edilen yüksek aerosolizasyon performansı, püskürtülerek kurutulmuş kolistin tozlarının pürüzlü yüzeyleri ve düşük yüzey enerjileri ile ilişkilendirilmiştir (183). Püskürtülerek kurutulmuş amorf kolistin tozları saklama süresince yeniden kristalize olmamış, saklama süresince stabil kalmıştır. Bu da püskürterek kurutma yönteminin inhale edilebilir ve stabil kolistin tozları üretimi için uygun bir yöntem olduğunu göstermiştir. Fakat ham ve püskürtülerek kurutulmuş kolistin tozlarının %90 bağıl neme maruz kaldıklarında %30'a kadar nem çektikleri gözlenmiştir. Nemden kaynaklanan stabilite sorunundan kaçınmak için her bir dozun hava geçirmeyecek şekilde ambalajlanması önerilmiştir (182).

Stabiliteyi korumak için, kristal form üretmek, higroskopik etkin maddeyi hidrofilik maddeler ile kaplamak, yeniden kristalizasyon gibi yöntemler olumlu sonuçlar vermiştir (97, 184-187).

Sonuç olarak, püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen, özellikle amorf tozların stabilite sorunları olmakla birlikte, bu sorunu aşmak için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir.

2.4. İnhaler Partiküllerinin Aerodinamik Parametreleri

Aerosolizasyon etkinliği arttıkça hastaların değişken inhalasyon yeteneklerinin, ilaç depolanmasına etkisi azalmakta, bu nedenle de inhalerlerin aerodinamik özelliklerinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır (188). Farklı dansite ve şekle sahip aerosol partikülleri aerodinamik özelliklerine bağlı olarak karakterize edilebilirler. İnhalerlerin aerodinamik davranışları aşağıdaki parametreler ile tanımlanabilir:

- a) Kütle Ortalama Aerodinamik Çap (KOAC) (*Mass Median Aerodynamic Diameter*): Aerodinamik partikül çapı, partikül ile aynı aerodinamik davranışa sahip 1 g/cm³ yoğunluğundaki kürenin çapıdır. Poröz veya içi boş yani dansitesi düşük partiküller aynı hacme sahip diğer partiküllerden daha küçük aerodinamik çapa sahiptirler. Aerodinamik çap Eşitlik 2.1. ile hesaplanır.

$$D_a = d \cdot \sqrt{p} \quad (2.1.)$$

Da=Aerodinamik çap
d=Partikülün fiziksel çapı
p=Dansite

- b) İnhaler Aygıtını Terk Eden Doz (*Emitted Dose*): İnhalasyon işlemi ile inhaler aygıtını terk ederek solunum sisteminin farklı aşamalarına geçen ilaç miktarı.
- c) İnce Partikül Fraksiyonu (İPF) (*Fine Particle Fraction*): Teorik olarak akciğerlerde respiratuar bölgeye ulaşacak fraksiyondur. Genellikle aerodinamik çapı 5 µm'den küçük olan partiküller olarak ifade edilir.
- d) İnce Partikül Dozu (İPD) (*Fine Particle Dose*): Teorik olarak akciğerlerde respiratuar bölgeye ulaşacak ilaç miktarıdır. Genellikle aerodinamik çapı 5 µm'den küçük olan partiküller olarak ifade edilir.

Partiküllerin aerodinamik özelliklerinin incelenmesi için farmakopelerde çeşitli ayırıştırıcı cihazlar tanımlanmıştır (Tablo 2.1.). Bu cihazlar aerosol partiküllerini veya damlacıklarını aerodinamik çaplarına göre sınıflandırmaktadır. Partiküller cihaz

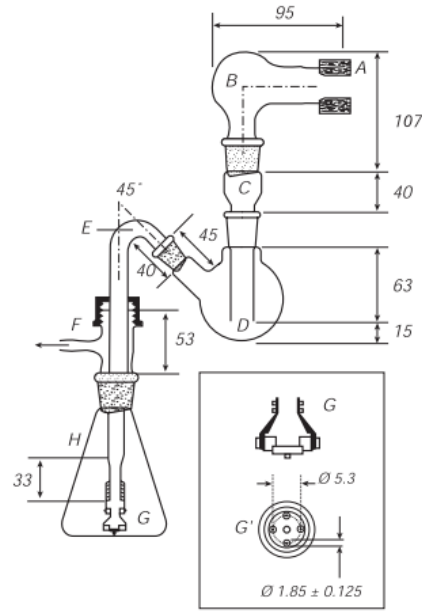
içinde hava akımının etkisi ile hareket ederek partikül büyüklüklerine göre farklı düzeylerde tutulurlar.

Tablo 2.1. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Farmakopelerine kayıtlı ayırıştırıcı örnekleri (189).

Ayrıştırıcı	Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi	Avrupa Farmakopesi
<i>Glass Twin Impinger</i> (Cam İkili Ayrıştırıcı)	-	Aygıt A (ÖDİ, KTİ, nebülizer)
<i>Andersen Cascade Impactor</i> (Andersen Kademeli Ayrıştırıcı) (Ön ayırıştırıcı içermeyen)	Aygıt 1 (ÖDİ)	Aygıt D (ÖDİ)
<i>Marple Miller Cascade Impactor</i>	Aygıt 2 (KTİ)	-
<i>Andersen Cascade Impactor</i> (Andersen Kademeli Ayrıştırıcı) (Ön ayırıştırıcı içeren)	Aygıt 3 (KTİ)	Aygıt D (KTİ)
<i>Multi Stage Liquid Impinger</i> (Çok Aşamalı Sıvı Ayrıştırıcı)	Aygıt 4 (KTİ)	Aygıt C (ÖDİ, KTİ)
<i>Next Generation Impactor</i> (Yeni Nesil Ayrıştırıcı)	Aygıt 5 (KTİ) Aygıt 6 (ÖDİ)	Aygıt E (ÖDİ, KTİ)

2.4.1. Cam İkili Ayrıştırıcı (*Glass Twin Impinger*)

Cam ikili ayırıştırıcı, rutin kalite kontrol amacıyla kullanılan, aygıt A olarak Avrupa Farmakopesinde (2.9.18) kayıtlı bir düzenektir. 60 ± 5 L/dk. akış hızının uygun olduğu KTİ, ÖDİ ve nebülizerler ile kullanılmaktadır. Cam ikili ayırıştırıcı, kullanımı ve montajı nispeten kolay bir yöntemdir. En önemli üstünlüğü, camdan üretilmesi sayesinde metal ayırıştırıcılarda görülen korozyona uğrama sorununun görülmemesidir. Cam ikili ayırıştırıcı, üst ve alt cam çarpma odalarının yanı sıra paslanmaz çelik plaka, ayaklık, kelepçe ve başlık gibi parçalarından oluşur (Şekil 2.15.). Ayrıca analiz için özel ağızlık adaptörü, vakum pompası ve akış ölçer gibi destek aygıtları kullanılmaktadır (101, 190).



Şekil 2.15. Cam ikili ayrıştırıcının şematik gösterimi (A: ağızlık, B: boğaz, C: boyun, D: üst çarpma odası, E: bağlantı tüpü, F: yan kol adaptörü, G: alt jet düzeneği, H: alt çarpma odası) (boyutlar mm cinsindedir) (190).

Sıvı sıkıştırma prensibi ile, inhalerden çıkan dozu, solunabilir ve solunamayan olmak üzere 2 fraksiyona ayırır. Solunamayan doz, orofarinkste tutulur ve daha sonra yutulur. Bu kısım cam ikili ayrıştırıcıda, cam boğazın arka kısmı ve üst çarpma odacığı ile temsil edilir (Aşama 1). Akciğerlere nüfuz eden doz alt çarpma odasında (Aşama 2) toplanır. 60 L/dk.'lık bir akış hızında çalışıldığında üst çarpma odasında $6,4 \mu\text{m}'$ den büyük, alt çarpma odasında $6,4 \mu\text{m}'$ den küçük partiküller tutulmaktadır (101, 190).

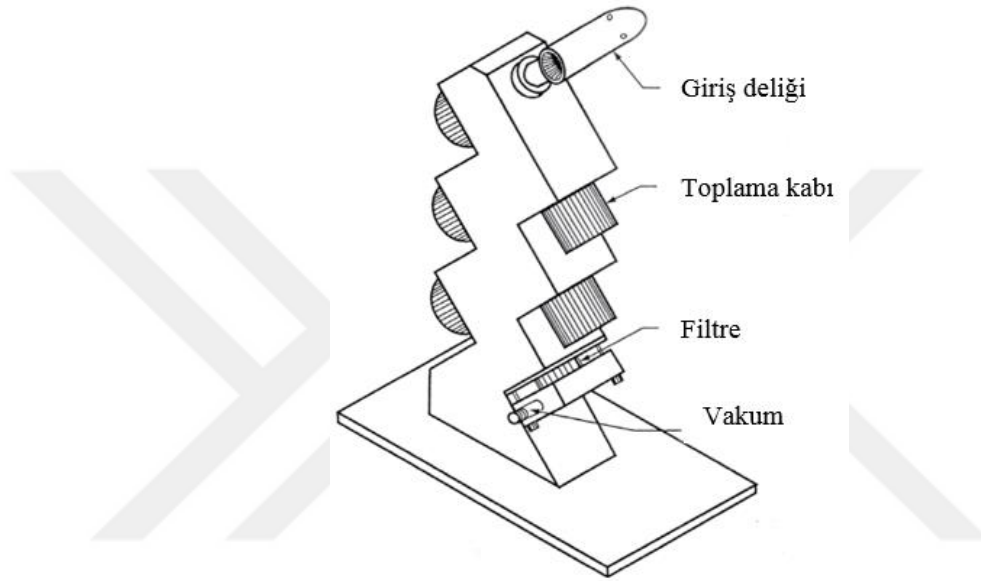
Cam ikili ayrıştırıcı ile analize başlamadan önce, genel olarak üst çarpma odasına 7 mL, alt çarpma odasına 30 mL çözücü koyulur. Deney tamamlandıktan sonra, alt çarpma odasında toplanan etkin madde miktarı saptanır ve verilen dozun yüzdesi olarak solunabilir fraksiyon ifade edilir (101, 190).

Genel olarak, ayrıntılı partikül büyüklüğü dağılımı bulgusu elde etmek için, en az beş ve tercihen daha fazla aşamaya sahip ayrıştırıcılar tercih edilir.

2.4.2. *Marple Miller Cascade Impactor*

Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi'nde Aygıt 2 olarak tanımlanmış, KTİ'lerin partikül büyüklüğünü (aerodinamik) saptamak üzere tasarlanmış, beş aşamalı bir ayrıştırıcıdır. 60 - 90 L/dk. akış hızı için kalibre edilmiştir. KTİ'lerin hızlı

ve basit bir şekilde geri kazanılmasını sağlamak için, cihazın her aşamasında çıkarılabilir toplama kapları bulunmaktadır. Ayrıca, toplam kütle dengesini korumak için Aşama 5'ten sonra bir filtre bulunmaktadır (Şekil 2.16.). 60 L/dk.'lık akış ile elde edilen *cutoff* büyüklüğü (Aşama 1: 10 μm , Aşama 2: 5,0 μm , Aşama 3: 2,5 μm , Aşama 4: 1,25 μm , Aşama 5: 0,63 μm) ile 90 L/dk.'lık akış ile elde edilen *cutoff* büyüklüğünden (Aşama 1: 8,1 μm , Aşama 2: 4,0 μm , Aşama 3: 2,0 μm , Aşama 4: 1,0 μm , Aşama 5: 0,5 μm) farklıdır (101, 190).



Şekil 2.16. *Marple Miller Cascade Impactor*'un şematik gösterimi (101).

Analiz edilen KTİ'ler, doğrudan çıkarılabilir toplama kaplarında toplandığı için, *Marple Miller Cascade Impactor* yöntemi ile her analiz sonrası tüm cihazı sökmeye gerek yoktur. Cihaz, aşamalar arası kaybı en düşük düzeyde tutmak üzere tasarlandığından, her test sonrasında aşamaları temizlemek gerekmemektedir. 30 - 60 L/dk. arası için kalibre edilmiş modelleri ve pediatrik uygulamalar için düşük akış hızlı (4,9 - 12 L/dk) modelleri bulunmaktadır (101, 190).

2.4.3. Andersen Kademeli Ayrıştırıcı (*Andersen Cascade Impactor*)

Andersen Cascade Impactor (ACI), inhale edilen ürünlerin analiz edilmesi amacıyla farmasötik endüstrisinde en yaygın kullanılan ayrıştırıcıdır. Sekiz aşamalı cihaz, ilk olarak bir bakteriyolojik hava örnekleyici olarak geliştirilmiş; sonrasında ise farmasötik endüstri tarafından ÖDİ ve KTİ'lerin analizinde kullanılmak üzere adapte edilmiştir. Hem Amerika Birleşik Devletleri hem de Avrupa Farmakopesine kayıtlı bir

yöntemdir. Endüstride uzun süre kullanılması nedeniyle birçok inhaler ilaç uygulaması, ACI'dan elde edilen verilere dayanmaktadır (101, 190).

ACI'nın üstünlükleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Farmakopeye kayıtlıdır, yasal otoriteler ve ilaç endüstrisi tarafından kabul edilmektedir.
- 0,4 - 9,0 µm arasında 8 aşama içermektedir.
- Alüminyum, paslanmaz çelik veya titanyum gibi materyal seçenekleri mevcuttur.
- Aşama 6 ve 7 kaldırıldığında yüksek akış hızlarında düşük akış direnci elde edilmektedir.
- Laboratuvar gibi sınırlı alanlarda kullanımı uygundur.
- Nazal aerosoller ve spreyle de çalışmak mümkündür.
- Zarar görmüş veya uygun olmayan aşamalar kolayca çıkarılabilir ve değiştirilebilir.
- Maliyeti düşüktür.

KTİ'lerin ACI ile analiz edilmeleri sırasında aşağıdaki hususlar dikkate alınmalıdır:

- Nefes alma sırasında basınç düşmektedir.
- 4 kPa basınç düşüşü sağlamak için uygun akış hızı seçilmelidir.
- İnhalasyonun simüle edilmesi aşamasında, inhalasyon süresi ve hızı 4 L hacim sağlayacak şekilde seçilmelidir.
- Akış hızının stabil olması gerekmektedir.

Genellikle düşük dirençli KTİ'lerde, 4 kPa'lık bir basınç düşüşü sağlamak için, 28,3 L/dk.'dan daha yüksek akış hızlarında çalışmak gerekmektedir. ACI, 28,3 L/dk.'dan daha yüksek akış hızlarında da çalıştırılabilir, fakat *cutoff* değerlerinde oluşacak değişim göz önünde bulundurulmalıdır. Akış hızı arttıkça aşamalar arasındaki ayırım kapasitesinin azaldığı bilinmektedir (101, 190).

Bu sorunu gidermek amacıyla, 60 ve 90 L/dk. akış hızı için ACI'nın iki ayrı konfigürasyonu kullanılmaktadır (191). 60 L/dk. akış hızı koşulunda, sistemden 0 ve 7 aşamaları çıkarılır, -0 ve -1 aşamaları eklenir. Benzer şekilde, 90 L/dk. koşulunda, 0, 6 ve 7 aşamaları kaldırılır, -0, -1 ve -2 aşamaları eklenir. Toplama plakalarında da

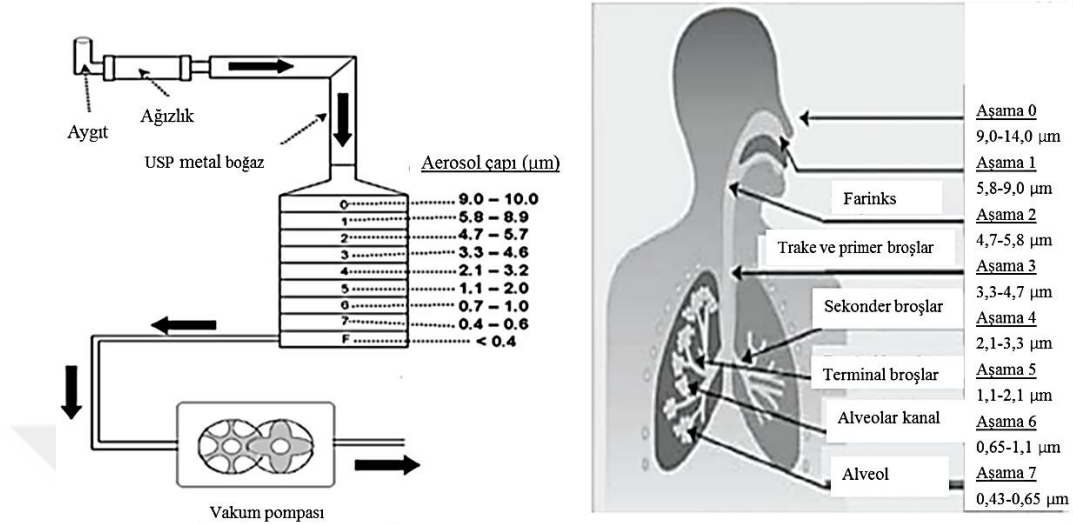
(merkezi delikli veya deliksiz) değişiklikler yapılır. Yapılan çalışmalar sonucunda bu akış koşulları için yeni *cutoff* değerleri elde edilmiştir (Tablo 2.2.) (101, 190).

Tablo 2.2. Farklı akış koşulları için ACI ile saptanan *cutoff* çapları (101).

Aşamalar	<i>Cutoff</i> Çapı (µm)		
	28,3 L/dk.	60 L/dk.	90 L/dk.
Aşama -2	-	-	8,0
Aşama -1	-	8,6	6,5
Aşama -0	-	6,5	5,2
Aşama 0	9,0	-	-
Aşama 1	5,8	4,4	3,5
Aşama 2	4,7	3,2	2,6
Aşama 3	3,3	1,9	1,7
Aşama 4	2,1	1,2	1,0
Aşama 5	1,1	0,55	0,22
Aşama 6	0,7	0,26	-
Aşama 7	0,4	-	-

Tez çalışmamız kapsamında, üretilen KTİ'lerin aerodinamik davranışlarını incelemek amacıyla, ACI cihazı kullanılmıştır. Cihaz, 8 aşama ve boğaz, ağızlık gibi parçalar içerir. Cihazın aşamalarına ulaşacak olan partiküllerin uçuşmasını engellemek için, her bir aşamaya, bir çözücü içinde (etanol, sikloheksan gibi) yüzey etkin madde (Span, Tween gibi) içeren çözelti uygulanır ve kurutulur. ACI düzeneği kurulduktan sonra, KTİ aygıtı ağızlık kısmına takılır, pompa ile toplamda 4 L hava akımı sağlanacak şekilde, uygun süre ve akış hızında çalışılır. Her bir aşama, boğaz, ağızlık, aygıt (kapsül ile birlikte) uygun bir çözücü ile yıkanarak belirli hacimde balon jöjelere alınır. Elde edilen çözeltiler uygun kantitatif yöntemler ile (HPLC gibi) analiz edilir ve her parçada tutulan ilaç miktarı hesaplanır. Her bir aşamada tutulan partikül büyüklükleri Şekil 2.17.'de verilmiştir. Aşama 3 ve daha ileriye giden partiküllerin aerodinamik çaplarının 5 µm'den küçük olduğu ve teorik olarak respiratuar bölgeye ulaşacakları bilinmektedir. Bu nedenle 5 µm'den küçük ilaç miktarı ve yüzdesi hesaplanır. Böylece ince partikül dozu ve ince partikül fraksiyonu bulunmuş olur. Aygıtı terk eden miktar bulunur, böylece *Emitted Dose* elde edilmiş olur. Aerodinamik

çapın fonksiyonu olarak yüzde kümülatif ilaç miktarının log-olasılık grafiği çizilerek KOAÇ değeri hesaplanır (101, 190).

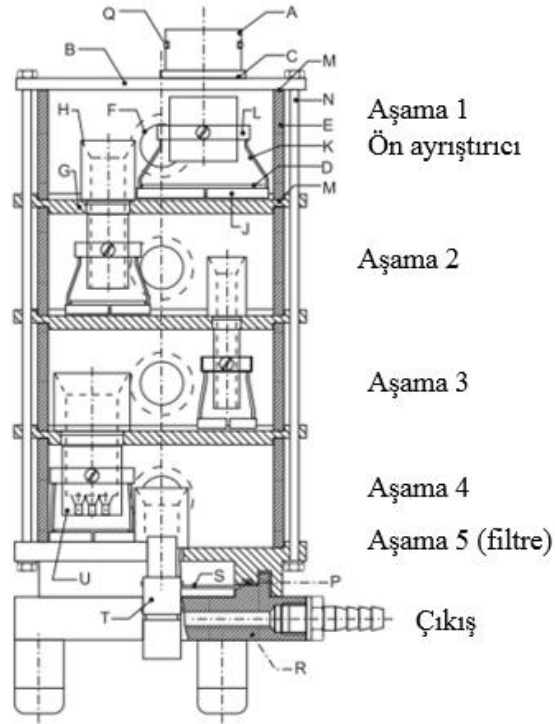


Şekil 2.17. ACI cihazındaki aşamaların insan solunum sisteminde karşılık geldiği bölgelerin şematik gösterimi (192).

2.4.4. Çok Aşamalı Sıvı Ayırıştırıcı (*Multi Stage Liquid Impinger*)

Multi Stage Liquid Impinger, KTI ve ÖDİ'lerin aerodinamik partikül büyüklüğü dağılımlarını ölçmek amacıyla kullanılan, 4 aşamalı, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Farmakopesine kayıtlı bir ayırıştırıcıdır. İnhaleleri analiz etmek amacıyla tasarlanan ilk cihazdır. Cihaz, alüminyum, paslanmaz çelik veya titanyum gibi materyallerden oluşabilir. Korozyon direnci, ağırlık ve maliyet gibi ölçütlere göre materyal seçimi yapılabilir (101, 190).

60 L/dk.'lık akış ile elde edilen *cutoff* büyüklüğü Aşama 1 için 13 µm, Aşama 2 için 6,8 µm, Aşama 3 için 3,1 µm, Aşama 4 için 1,7 µm'dir. Aşama 5'te bulunan filtre, 1,7 µm'den küçük partikülleri tutmaktadır. Cihaz, aşamalar arasında madde kaybı olmayacak şekilde tasarlanmıştır ve 30 - 100 L/dk. akış hızı koşullarında kullanım için uygundur. ACI, *Next Generation Impactor* ve *Marple Miller Cascade Impactor*'den farklı olarak, toplama aşamaları nemli tutulur ve bu da partiküllerin aşamalar arasında hareket etme riskini azaltmaya yardımcı olur. *Multi Stage Liquid Impinger*, ACI ile aynı sistem bileşenlerine sahiptir; sadece Aşama 1, ön ayırıcı işlevi gördüğü için *Multi Stage Liquid Impinger*'de ön ayırıcı bulunmamaktadır (101, 190) (Şekil 2.18.).

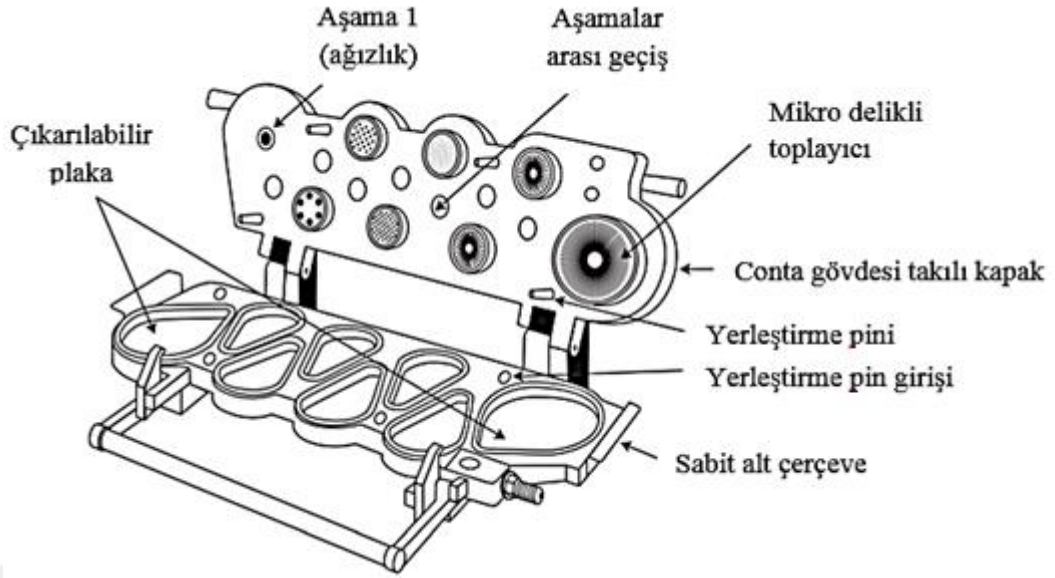


Şekil 2.18. *Multi Stage Liquid Impinger*'ın şematik gösterimi (190).

2.4.5. Yeni Nesil Ayrıştırıcı (Next Generation Impactor)

Next Generation Impactor, 2000 yılında piyasaya sürülmüştür. Cihaz, yedi aşama ve bir mikro-delik toplayıcı (MOC) içeren, yüksek performanslı, hassas, partikülleri fraksiyonlarına ayıran bir ayrıştırıcıdır (Şekil 2.19.). 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 (101, 190).

ACI ve *Next Generation Impactor* arasında partikül büyüklüğü dağılımları açısından iyi bir korelasyon olduğu görülmüştür, fakat bu durum, tüm KTI'ler için değiştirilebilir oldukları anlamına gelmemektedir (101, 190).



Şekil 2.19. *Next Generation Impactor*'ün şematik gösterimi (190).

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 değişmektedir.
- 30 - 100 L/dk. akış hızlarında 0,54 - 6,12 μm *cutoff* değerine sahiptir.
- 15 - 100 L/dk. arasındaki akış hızlarında çalışmak mümkündür.
- Verim, doğruluk ve tekrarlanabilirlik kapasitesi yüksektir.
- 7 aşamalıdır.
- Aşamalar arası kayıplar az olduğu için ilaç geri kazanımı yüksektir.
- Yarı ve tam otomasyona uygundur.

15, 30, 60 ve 100 L/dk. akış hızı koşullarında elde edilen *cutoff* değerleri Tablo 2.3.'te verilmiştir.

Tablo 2.3. Farklı akış koşulları için *Next Generation Impactor* ile saptanan *cutoff* çapları (101).

Aşamalar	Cutoff Çapı (µm)			
	15 L/dk.	30 L/dk.	60 L/dk.	100 L/dk.
Aşama 1	14,10	11,76	8,06	6,12
Aşama 2	8,61	6,40	4,46	3,42
Aşama 3	5,39	3,99	2,82	2,18
Aşama 4	3,30	2,30	1,66	1,31
Aşama 5	2,08	1,36	0,94	0,72
Aşama 6	1,36	0,83	0,55	0,40
Aşama 7	0,98	0,54	0,34	0,24
MOC	0,70	0,36	0,14	0,07

Next Generation Impactor üç ana bölümden oluşur:

1. Sekiz toplama kabı içeren tepsi
2. Tepsiyi desteklemek için kullanılan alt çerçeve
3. Aşamalar arası geçitlerin bulunduğu kapak ve püskürtücüleri yerinde tutan conta gövdesi

2.5. Calu-3 Hücre Hattı ile Permeabilite Çalışmaları

Etkin maddelerin permeabilitesi, toksisitesi veya klerensi gibi özelliklerini inceleyebilmek için hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Akciğerlere uygulanan ilaçlarla çalışırken; A549 (akciğer alveol epitel hücreleri), 16HBE14o– (bronşial epitel hücreleri, 1 yaş, erkek, kalp-akciğer nakli hastasından alınmıştır), BEAS-2B (adenovirüs 12 ve Simian virüs 40'ın hibrit virüsü ile ölümsüzleştirilmiş insan epitel hücreleri), NuLi-1 (Primer hava yolu epitel hücrelerinin, hTERT ve HPV-16 E6/E7 eksprese eden retro virüslerle enfekte edilmesi ile elde edilir) gibi pek çok hücre hattı kullanılabilir. Fakat insan hava yolu epitel bariyerini en iyi şekilde taklit eden, bu nedenle inhalerlerin permeabilite çalışmalarında en çok tercih edilen hücre hattı, insan bronşial epitel hücreleri (akciğer adenokarsinoma) olan Calu-3'tür (193).

Calu-3 hücreleri hem sıvıya batık (LCC) olarak hem de hava arayüzeyinde (AIC) büyütülebilmektedir. Bu hücrelerin en önemli üstünlüğü hava ara yüzeyinde büyütüldüklerinde hücrenin hava tarafında yani apikal yüzeyinde, akciğerlerde de

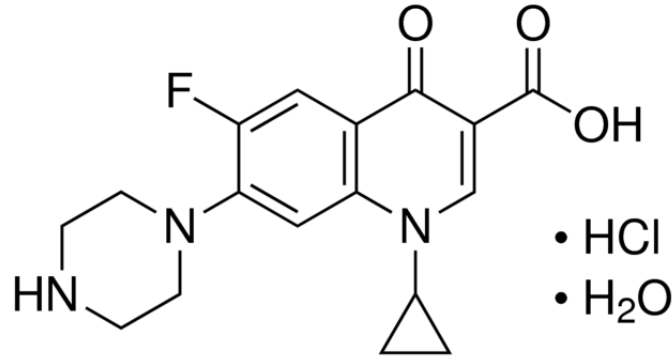
olduğu gibi, mukus oluşmasıdır (194, 195). Yapılan çalışmalar, morfoloji ve permeabilite değerleri göz önüne alındığında, hava ara yüzeyinde büyütülen Calu-3 hücrelerinin, sıvıya batık büyütülen Calu-3 hücreleri ile karşılaştırıldığında akciğer yapısını (mukus üretimi, trans-epitelyal direnç, morfoloji ve transporter üretimi) daha iyi yansıttığını göstermiştir (196, 197).

Calu-3 hücre hattı ile birçok inhaler ilacın permeabilitesi incelenmiştir. Örneğin, salbutamol sülfat ve budesonid ilaçlarının permeabiliteleri araştırılmış, permeabilitenin taşıyıcının partikül büyüklüğünden etkilendiği ve derişime bağlı olarak gerçekleştiği gözlenmiştir (194, 198). Bir başka çalışmada, Calu-3 hücre hattı kullanılarak siprofloksasin maddesinin permeabilite tayini yapılmış, siprofloksasinin *influx* ve *efflux* substratı olduğu görülmüştür (197, 199).

2.6. Siprofloksasin

2.6.1. Fizikokimyasal Özellikler

Siprofloksasin hidroklorür monohidrat (1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4-okso-7-(1-piperazinil)-3-kinolinkarboksilik asit hidroklorür monohidrat) maddesinin kimyasal formülü Şekil 2.20.'de verilmiştir (200).



Şekil 2.20. Siprofloksasin hidroklorür monohidratın kimyasal yapısı (200).

Kapalı formülü $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl \cdot H_2O$ ve molekül ağırlığı 385,82 g/mol olan siprofloksasin hidroklorür monohidrat sarımsı, kristal, higroskopik bir tozdur (200, 201). Siprofloksasinin çözünürlük bilgileri Tablo 2.4.'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Siprofloksasin hidroklorür monohidratın çözünürlük bilgileri (200, 201).

Çözücü	Çözünürlük
Su	Çözünür
Dehidrate alkol	Çok az çözünür
Aseton	Çözünmez
Diklorometan	Çözünmez
Etil asetat	Çözünmez
Metanol	Az çözünür

2.6.2. Farmakolojik Etki Mekanizması

Siprofloksasin akciğer dokusuna iyi penetre olan geniş spektrumlu florokinolon grubu bir antibiyotiktir. Siprofloksasin ikinci kuşak antibiyotik olup, Gram-negatif pek çok bakteriye ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya en etkili (MİD₅₀ – MİD₉₀: 0,25-1 mg/mL) kinolondur. Florokinolonlar; aminoglikozidler ve beta laktamların aksine, intraselüler ve ekstraselüler patojenlerden kaynaklanan respiratuar enfeksiyonlara karşı etkilidir. Siprofloksasin, tüm kinolonlar gibi bakteriyel topoizomerazlara etki ederek DNA sentezini inhibe eder, böylece bakterisidal etki gösterir, aerobik gram-negatif çomaklara karşı oldukça düşük derişimlerde (≤ 1 mg/mL) etkilidir (202-205).

Siprofloksasin bronş epiteli boyunca transepitelyal permeasyon ile akciğer dokusuna penetre olur. Literatürde siprofloksasinin ağırlıklı olarak aktif *influx* (OCT, OATP2B1) ve nispeten daha az *efflux transporter* (P-gp, MRPs) substratı olduğu belirlenmiştir (197). Yapılan bir araştırmada florokinolon antibiyotiklerinin aktif transportla mı yoksa pasif difüzyonla mı geçtiği incelenmiştir. İnceleme sonucunda; lipofilite düştükçe aktif transportun daha fazla gözlendiği belirtilmiş; Calu-3 hücre hattı kullanılarak siprofloksasin HCl, moksifloksasin HCl, grepafloksasin HCl, levofloksasin, pefloksasin, norfloksasin florokinolonlarının permeabiliteleri araştırılmış; florokinolonların, *efflux transporter* olan P-gp substratı oldukları belirlenmiştir (206).

2.6.3. Farmakokinetik Özellikler

Siprofloksasinin oral biyoyararlanımı %70, absorpsiyon kinetiği ise doğrusaldır. Oral alımdan 1-2 saat sonra maksimum plazma derişimine ulaşılır. Absorpsiyon antiasitler, alüminyum, kalsiyum, demir, çinko, magnezyum içeren preparatlarla azalır. Gıda alımı plazmada maksimum derişime ulaşmak için gerekli süreyi uzatır. Mide-bağırsak kanalından hızla emilir ve yavaş elimine olur. Plazma yarılanma ömrü 4 saattir. Siprofloksasin, beyin-omurilik sıvısı hariç tüm vücut sıvıları ve dokularda dağılır. Eliminasyonda hepatik biyotransformasyon da etkilidir (202-205, 207). Siprofloksasin BSS ve BDDCS sınıf IV ilaçtır (208, 209).

2.6.4. Yan etkiler

Sıklıkla mide-bağırsak sistemi ile ilgili yan etkiler gözlenir. Baş ağrısı, baş dönmesi, uyku bozuklukları, ruhsal durum değişiklikleri gibi bulgular, santral sinir sistemine ilişkin gözlenen yan etkilerdir. Alerjik reaksiyonlar ve karaciğer fonksiyon testlerinde yükselmeler görülmektedir (202-205).

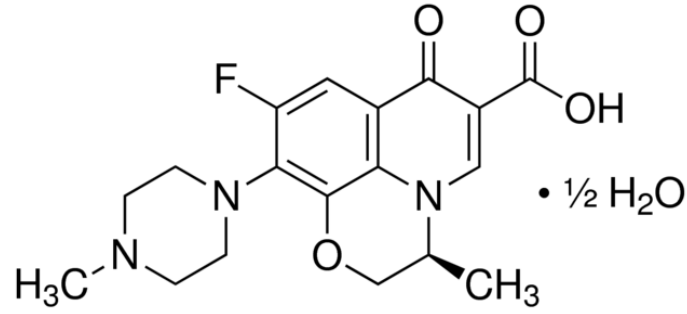
2.6.5. Ticari Preparatlar

Oftalmik çözeltileri (%0,2, Cetraxal[®], Wraser Pharms), oftalmik merhemleri (%0,3, Ciloxan[®], Novartis Pharms Corp), oftalmik süspansiyonları (%0,2, Cipro HC[®], Novartis Pharms Corp), enjeksiyonluk preparatları (10 mg/mL, Cipro[®], Bayer HealthCare), oral süspansiyon için toz preparatları (250 mg / 5 mL ve 500 mg / 5 mL, Cipro[®], Bayer HealthCare), oral tabletleri (100 mg, 250 mg, 500 mg, 750 mg, Cipro[®], Bayer HealthCare), uzatılmış salım sağlayan tablet preparatları (212,6 mg ve 425,2 mg, Cipro XR[®], Bayer Pharms) piyasada mevcuttur ve FDA tarafından onaylıdır (210). Faz 3 klinik çalışma aşamasında olan siprofloksasin içeren KTİ dozu 32,5 mg olarak seçilmiştir (Bayer HealthCare, PulmoSphere[™]; Novartis) (36).

2.7. Levofloksasin

2.7.1. Fizikokimyasal Özellikler

Levofloksasin hemihidrat ((-)-(S)-9-floro-2,3-dihidro-3-metil10-(4-metil-1-piperazinil)-7-okso-7H-pirido[1,2,3-de]1,4-benzoksazin-6-karboksilikasithemihidrat) maddesinin kimyasal formülü Şekil 2.21.'de verilmiştir (211).



Şekil 2.21. Levofloksasin hemihidratın kimyasal yapısı (211).

Kapalı formülü $C_{18}H_{20}FN_3O_4 \cdot 0.5H_2O$ ve molekül ağırlığı 370,38 g/mol olan levofloksasin hemihidrat katı formunda iken kokusuz, sarımsı beyaz renkli, kristal bir tozdur. Çözünürlük bilgileri Tablo 2.5.'te verilmiştir (212). Levofloksasin pH 1-8 arasında pH'ya bağımlı çözünürlük göstermektedir (30-300 mg/mL) (213).

Tablo 2.5. Levofloksasin hemihidratın çözünürlük bilgileri (212).

Çözücü	Çözünürlük
Su	Az çözünür
Glasiyel asetik asit	Kolay çözünür
PBS (pH 7,4)	Çözünür
Etanol	Az çözünür
Metanol	Zor çözünür
Kloroform	Kolay çözünür

2.7.2. Farmakolojik Etki Mekanizması

Levofloksasin geniş spektrumlu, gram-pozitif, gram-negatif ve atipik respiratuar patojenlere karşı etkili bir florokinolon antibiyotiktir. Antibakteriyel etkisini DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü inhibe ederek gösterir (214, 215). Siprofloksasin ve ofloksasin ile kıyaslandığında *Streptococcus pneumoniae*'ye karşı daha etkili bir antibiyotiktir. Yaygın olarak solunum ve idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılır. Polimorfonükleer lökositlere iyi penetre olduğu için enfeksiyon bölgesine yüksek miktarlarda ulaşabilir.

2.7.3. Farmakokinetik Özellikler

Levofloksasinin mutlak biyoyararlanımı % 99'dur. Dağılım hacmi 1,1 L/kg'dır ve proteinlere bağlanması %24-38'dir. Değişmemiş ilaç olarak dozunun %64-102'si böbrekler yoluyla atılır. Yarılanma ömrü 6-9 saat arasındadır (216). Levofloksasin BSS sınıf I, BDDCS sınıf III ilaçtır (208, 209).

2.7.4. Yan etkiler

Levofloksasin diğer kinolonlarla karşılaştırıldığında genellikle iyi tolere edilir, en sık bildirilen yan etkiler mide bulantısı ve ishaldir. Nadiren kardiyak ve hepatik yan etkiler görülür. 7-10 gün süresince günde bir kez 250 mg veya 14 gün boyunca günde bir kez 500 mg alınan ilacın iyi tolere edildiği gösterilmiştir (216).

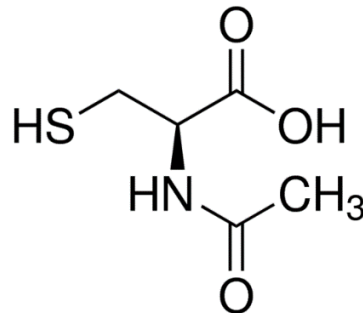
2.7.5. Ticari Preparatlar

Oral tabletleri (250 mg, 500 mg ve 750 mg, Levaquin[®], Janssen Pharms), enjeksiyonluk preparatları (25 mg/mL, Levaquin[®], Janssen Pharms), oral çözeltileri (250 mg/10 mL, Levaquin[®], Janssen Pharms) piyasada mevcuttur ve FDA tarafından onaylıdır (210). Levofloksasinin inhalasyon için nebulizer çözeltisi dozu 240 mg'dır (Quinsair[®]; Raptor Pharmaceuticals) (38).

2.8. Asetilsistein

2.8.1. Fizikokimyasal Özellikler

Asetilsistein N-Acetyl-L-cysteine maddesinin kimyasal formülü Şekil 2.22.'de verilmiştir (217).



Şekil 2.22. Asetilsisteinin kimyasal yapısı (217).

Kapalı formülü $C_5H_9NO_3S$ ve molekül ağırlığı 163,2 g/mol olan asetilsistein katı formunda iken beyaz veya renksiz kristal bir tozudur. Alkolde ve suda serbestçe çözünür (218).

2.8.2. Farmakolojik Etki Mekanizması

N-asetilsistein indirgenmiş glutatyonun ve L-sisteinin asetilenmiş halidir. Solunum hastalıkları, HIV enfeksiyonları, kanser ve çeşitli kalp hastalıkları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Kronik solunum sistemi hastalıklarında mukolitik ajan olarak kullanılır (219). N-asetilsistein hücre membranını geçip hücre içinde sisteine dönerek glutatyon üretimini artırır (220). Glutatyonun fizyolojik öncüsü olan sisteinin, kimyasal mutajenlere ve radyasyona karşı koruyucu özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (221). N-asetilsisteinin antioksidan ve antienflamatuar etkileri de bulunmaktadır (222). Endotelial disfonksiyon, pulmoner fibroz, inflamasyon, invazyon, kıkırdak erozyonu ve asetaminofen detoksifikasyonu azaltıcı terapötik etkileri vardır (223).

2.8.3. Farmakokinetik Özellikler

Sülfidril grubu içerdiği için oral alımı sonrasında gastrointestinal sistemden hızlıca emilir. Bağırsak ve karaciğerde asetil grubu uzaklaştırılarak metabolize edilir. Oral kullanımından 1 saat sonra en yüksek plazma değerine ulaşır ve 12 saat sonra plazmadan tamamen temizlenir (224).

2.8.4. Yan etkiler

Anafilaktoid reaksiyonlar, cilt döküntüsü, cilt kaşıntısı, eritem, ürtiker, farenjit, bulantı, hemoptizi, kusma, stomatit, ateş, ödem gibi yan etkileri bulunmaktadır.

2.8.5. Ticari Preparatlar

Enjeksiyonluk preparatları (200 mg/mL, Acetadote[®], Cumberland Pharms), oral efervesan tablet preparatları (500 mg ve 2,5 g, Cetylev[®], Arbor Pharms LLC), inhalasyon için oral çözelti preparatları (%10 ve %20, Mucomyst[®], Apothecon Inc Div Bristol Myers Squibb) piyasada mevcuttur ve FDA tarafından onaylıdır (210).

2.9. Dornaz alfa

2.9.1. Fizikokimyasal Özellikler

Deoxyribonuclease I (human recombinant), kapalı formülü $C_{1321}H_{1995}N_{339}O_{396}S_9$ ve molekül ağırlığı 29249,6 g/mol olan dornaz alfa rekombinant bir enzimdir (225). Çalışmamızda dornaz alfa kaynağı olarak Pulmozyme® ticari isimli piyasa preparatı kullanılmıştır. Pulmozyme inhalasyon amacı ile kullanılan bir çözeltilidir ve her bir mL sulu çözelti 1 mg dornaz alfa, 0,15 mg kalsiyum klorür dihidrat ve 8,77 mg sodyum klorür içerir.

2.9.2. Farmakolojik Etki Mekanizması

Dornaz alfa kistik fibrozis hastalarında lökositlerin, bakterilerin ve makrofajların parçalanmasına bağlı olarak akciğer sıvısında yüksek miktarlarda bulunan ekstraselüler DNA'yı parçalamakta, buna bağlı olarak da balgamın viskozitesini azaltarak mukosilyer klerensi arttırmaktadır. Dornaz alfa, kistik fibrozisli hastalarda tekrarlayan enfeksiyonların tedavisinde mukolitik amaçla kullanılmaktadır. Klinik araştırmalar, tedavisine dornaz alfa dahil edilen kistik fibrozis hastalarında dispne, öksürük sıklığı ve göğüsteki konjestiyonun azaldığını göstermiştir (226-228).

Yang ve ark. yaptığı bir çalışmada siprofloksasin ve rekombinant deoksiribonükleaz ilaçları araştırılmıştır. Çalışmada siprofloksasin ve rekombinant deoksiribonükleaz birlikte püskürtülerek kurutulmuş ve 5 µm'den küçük partikül boyutunda KTİ elde edilmiştir. Yardımcı madde olarak dipalmitilfosfatidilkolin, albumin ve laktoz kullanılmıştır. Sonuç olarak siprofloksasin/rekombinant deoksiribonükleaz kombinasyonu ile tek başına siprofloksasine göre daha yüksek antibiyotik aktivitesi elde edilmiştir. Etkinlik, yapay balgam ortamı (*artificial sputum medium*) ile çalışılarak değerlendirilmiş ve bu farkın mukolitik (rekombinant deoksiribonükleaz) kullanılmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Mukolitik kullanımı ile siprofloksasinin hem çözünme hem de difüzyon özellikleri artmıştır (26).

2.9.3. Farmakokinetik Özellikler

Sıçanlar ve maymunlardaki çalışmalar, intravenöz uygulama sonrasında dornaz alfanın serumdan hızlıca temizlendiğini göstermiştir. 2,5 mg dornaz alfa

inhalasyonu, kistik fibrozis hastalarında 15 dakika içinde, balgamdaki ortalama dornaz alfa derişiminin yaklaşık olarak 3 µg/mL derişime çıkmasını sağlamaktadır. Dornaz alfanın, proteazlar tarafından metabolize edildiği bilinmektedir. Yarılanma ömrü 3-4 saattir. Sıçanlarla yapılan çalışmalar, aeorosol uygulama sonrasında dornaz alfanın akciğerlerden eliminasyon yarılanma ömrünün 11 saat olduğunu göstermiştir. İnsanlarda, balgamdaki derişim, uygulamadan 2 saat sonra yarıya düşerken balgam reolojisi üzerindeki etkinin 12 saatten uzun bir süre devam ettiği gözlenmiştir (229).

2.9.4. Yan Etkiler

Cilt döküntüsü, ürtiker, farenjit, larenjit, dispepsi, ateş, ses boğukluğu, dispne, göğüs ağrısı, öksürük, rinit gibi yan etkileri mevcuttur.

2.9.5. Ticari Preparatlar

2,5 mg/2,5 mL'lik inhaler için çözelti preparatları (Pulmozyme İnhalasyon Solüsyonu[®], Roche, Genentech) piyasada bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler, Malzemeler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Asetilsistein	Dr. Reddy's Lab. / Hindistan
Asetonitril	Sigma-Aldrich / Almanya
BCA protein kiti	Thermo Fisher Scientific / ABD
Calu-3 hücre hattı	ATCC / ABD
Dietileter	Sigma-Aldrich / Almanya
DMEM/Ham's F-12 hücre ortamı	Biochrom / Almanya
Etanol	Sigma-Aldrich / Almanya
Fetal Sığır Serumu	Biochrom / Almanya
Hank'in Salin Çözeltisi (HBSS)	Biochrom / Almanya
HPMC kapsülleri (boyut 3)	Capsugel, Colmar / Fransa
Insert (0,4 µm)	Greiner Bio One / Almanya
İzopropil alkol	Sigma-Aldrich / Almanya
Levofloksasin hemihidrat	Dr. Reddy's Lab. / Hindistan
Metanol	Sigma-Aldrich / Almanya
Penisilin/Streptomisin	Biochrom / Almanya
Plaka (12 kuyucuklu)	Greiner Bio One / Almanya
Plaka (96 kuyucuklu)	Greiner Bio One / Almanya
Potasyum fosfat monobazik	Sigma-Aldrich / Almanya
Potasyum hidrojen ftalat	Sigma-Aldrich / Almanya
Pulmozyme®	Roche / İsviçre
RS01 inhaler aygıtı	Plastiap SpA / İtalya
Siprofloksasin hidroklorür	Dr. Reddy's Lab. / Hindistan
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich / Almanya
Steril flask (25 cm ²)	Greiner Bio One / Almanya
Tiazolil mavi tetrazolyum bromür	Applichem / Almanya
Tripsin/EDTA (%0,25/%0,02)	Biochrom / Almanya

3.1.2. Kullanılan Aletler

Andersen Cascade Impactor	Copley Scientific / İngiltere
Bilyalı değirmen	Retch / Almanya
CO ₂ 'li inkübatör	Sanyo / Japonya
Çevrik (<i>inverted</i>) mikroskop	Leica / Almanya
Çözünme cihazı	Sotax CH-4123 / İsviçre
Diferansiyel taramalı kalorimetre	Mettler Toledo / İsviçre
Diferansiyel taramalı kalorimetre	Q100 V9.4 Build 287 / ABD
Dry Powder Insufflator™ for Rat-Model DP-4-R	Penn-Century / ABD
ELISA mikroplaka okuyucu	VersaMax / ABD
Etüv	Dedeoğlu / Türkiye
Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi	Perkin Elmer / ABD
Hassas terazi AX200	Shimadzu / Japonya
Homojenizatör	Microfluidics M-110P / ABD
HPLC	Agilent / Almanya
HPLC dedektörü	Agilent / Almanya
HPLC kolonu	Inertsil ODS-3V / Japonya
Laminar akışlı hücre kültürü kabini	Faster BHG 2004 Biolab / İtalya
Manyetik karıştırıcı	Heidolph / Almanya
Mastersizer (Hydro2000S ve Scirocco 2000)	Malvern / İngiltere
Millipore MilliQ su saflaştırma sistemi	Millipore / Almanya
pH metre	Sartorius / Almanya
Püskürterek kurutma cihazı	Buchi B-290 / İsviçre
Taramalı elektron mikroskobu	Quanta400F Field Emission/ABD
Termogravimetrik analiz	Mettler Toledo / İsviçre
Ultrasonik banyo	Advantage Lab. / Belçika
UV Spektrofotometre	Shimadzu / Japonya
X-Işını difraktometresi	Rigaku Ultima-IV / Japonya
Yatay çalkalayıcı su banyosu	Memmert / Almanya

3.2. Etkin Maddeler Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Çalışmamızda etkin madde olarak kullanılan siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ve dornaz alfa maddelerinin UV spektrumları çekilmiş; siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein maddelerinin fizikokimyasal özelliklerini tayin etmek amacıyla *Fourier Transform Infrared* Spektrofotometresi (FT-IR), diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz (DSC), termogravimetrik analiz (TGA), X-ışını kırınımı analizi (XRD), taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi ve partikül büyüklüğü dağılımı analizi yapılmıştır. Dornaz alfa kaynağı olarak Pulmozyme® (inhaler için çözelti) piyasa preparatı kullanıldığından, yukarıdaki analizler dornaz alfa için yapılmamıştır.

3.2.1. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin UV Spektrumu

Siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ve dornaz alfa maddelerinin UV spektrumları, maddelerin 1x1 cm kuartz hücreler içerisindeki 25 µg/mL'lik sulu çözeltilerinin (dornaz alfa için Pulmozyme® çözeltisinin seyreltilmesi ile), 190 – 400 nm dalga boyları arasında Shimadzu UV spektrofotometre (Japonya) kullanılarak taranması ile elde edilmiştir. Elde edilen spektrumlardan her maddeye ilişkin maksimum dalga boyları (λ_{maks}) saptanmış ve literatür bulguları ile karşılaştırılmıştır.

3.2.2. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR)

Toz halindeki siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein maddelerinin ve siprofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımlarının, 600-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında Perkin Elmer FT-IR spektrofotometresi (ABD) ile spektrumları çekilmiş ve elde edilen spektrumlar literatür bulguları ile karşılaştırılmıştır.

3.2.3. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi (DSC)

Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein maddelerinin DSC analizi, Mettler Toledo DSC (İsviçre) cihazı kullanılarak, siprofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımlarının DSC analizi, DSC Q100 V9.4 Build 287 (ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Alüminyum panlar içerisine yerleştirilen

örneklerin (5-10 mg) 10°C/dk. hızda, siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein için sırasıyla 25°C–350°C, 25°C–250°C, 25°C–140°C sıcaklık aralıklarında, azot atmosferi altında DSC termogramları çekilmiştir.

3.2.4. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Termogravimetrik Analizi (TGA)

Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein maddelerinin TGA analizi, METTLER Toledo TGA/DSC1 (İsviçre) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Seramik panlar içerisine tartılan örnekler (5-10 mg), 80 mL/dk. azot gazı akışı altında, 25°C'den 250°C'ye 10°C/dk. hızla ısıtılmış ve bu koşullar altında TGA termogramları çekilmiştir.

3.2.5. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)

Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein maddelerinin ve siprofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımlarının XRD analizleri, Rigaku Ultima-IV (Japonya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 5 mg madde, iyice toz edilip plakalar arasına yerleştirilmiş, 40 kV voltajda, 2°/dk. tarama hızında, 2θ:2–70° arası taranarak maddelerin XRD difraktogramları elde edilmiştir.

3.2.6. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi (SEM)

Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein maddeleri altınla kaplandıktan sonra QUANTA 400F Field Emission (SEM) cihazı ile ayrı ayrı görüntülenmiştir.

3.2.7. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein maddelerinin partikül büyüklüğü dağılımı tayini için Mastersizer (Hydro 2000S ve Scirocco 2000) cihazı kullanılmıştır. Dornaz alfa kaynağı olarak Pumozyne® piyasa preparatı çözelti şeklinde kullanıldığından partikül büyüklüğü ölçülemediği için işlem görmemiş siprofloksasin ve levofloksasin etkin maddeleri uygun miktarda izopropil alkolde disperse edilmiştir. Elde edilen dispersiyonlar, obskürasyon değerleri %5-15 arasında olacak şekilde

cihazın haznesine damlatılmış, 1750 rpm karıştırma hızı altında Malvern Mastersizer Hydro 2000S (İngiltere) cihazı ile maddelerin partikül büyüklüğü dağılımları ölçülmüştür. Asetilsistein, Malvern Mastersizer Hydro 2000S (İngiltere) cihazında kullanılması uygun olan birçok sıvıda çözüldüğü için, sıvı içerisinde disperse edilerek partikül büyüklüğü dağılımının ölçülmesi mümkün olmamıştır. Bu nedenle kuru toz şeklindeki işlem görmemiş asetilsisteinin partikül büyüklüğü dağılımı, Malvern Mastersizer Scirocco 2000 (İngiltere) cihazı ve 5,40 mm ağız çapına sahip en küçük tepsi kullanılarak, %2,33 obskürasyon değerinde ölçülmüştür. Siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ve izopropil alkol için literatürden elde edilen refraktif indeks değerleri sırasıyla 1,655, 1,669, 1,520 ve 1,390'dır (230-233).

3.3. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsistein Maddelerinin Miktar Tayini

Siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein maddelerinin miktar tayininde DAD dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Agilent, Almanya) sistemi kullanılmıştır. İçerik tekdüzeliği, çözünürlük, çözünme, ACI ve permeabilite çalışmalarında kullanılan ortamlar göz önünde bulundurularak, her bir ortamda kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin HPLC yönteminde mobil faz olarak metanol:25 mM KH_2PO_4 (fosforik asit ile pH 3'e ayarlanmıştır) karışımı 28:72 oranında kullanılmış ve ayırım Inertsil ODS-3V HPLC kolonu (Japonya) ile gerçekleştirilmiştir. Miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.

Enjeksiyon hacmi	5 μL
Akış hızı	1 mL/dk.
Dedektör	DAD
Dalga boyu	Siprofloksasin ve levofloksasin için 293 nm, asetilsistein için 214 nm
Kolon	Inertsil ODS-3V 4,6 x 250 mm
Mobil faz	metanol:25 mM KH_2PO_4 (fosforik asit ile pH 3'e ayarlanmıştır) (28:72)
Sıcaklık	40°C

3.3.1. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

Siprofloksasin ve levofloksasin maddelerinin mobil faz içindeki 1000 µg/mL derişimdeki stok çözeltileri, asetilsistein maddesinin mobil faz içindeki (1:2000 oranında sodyum metabisülfite içeren) 1000 µg/mL derişimdeki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden hareketle 5-400 µg/mL derişim değerleri arasında çeşitli derişimlerde siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin HPLC ile analiz edilmesi sonucu elde edilen pik alanları ile 6 farklı kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğruları üzerinde istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır.

3.3.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, kullanılan analitik yöntemden elde edilen verilerin güvenilirliği hakkında bilgi verir. Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin *in vitro* miktar tayin yönteminin validasyonu için doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik), duyarlılık, özgünlük, saptanabilirlik sınırı ve tayin edilebilirlik sınırı, dayanıklılık (etkin maddenin saptanması ve tayini aşamasında) gibi ölçütler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Doğrusallık (*Linearity*)

Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin *in vitro* miktar tayini için kullanılan yöntemde, seçilen derişim aralığında, artan derişim ile doğru orantılı olarak artan siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin pik alanları arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığı değerlendirilmiştir. Hazırlanan stok çözeltilerden (1000 µg/mL) hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda hazırlanan örneklerin analizi Tablo 3.1.'de verilen HPLC koşulları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pik alanlarına karşılık gelen derişimlerden hareketle kalibrasyon doğrusu denklemi ve determinasyon katsayısı elde edilmiştir.

Doğruluk (*Accuracy*)

Doğruluk incelemesi, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen bulguların gerçek değerlere yakınlığının gösterilmesi amacıyla yapılmaktadır. Tez çalışması

kapsamında, düşük, orta, yüksek olmak üzere üç farklı derişimde (10 µg/mL, 100 µg/mL, 400 µg/mL) örnek hazırlanmış, aynı gün içerisinde her bir örnek HPLC yöntemi ile 6 kez analiz edilmiş, sonuçların gerçek değerlere yakınlığı, % geri kazanım değeri hesaplanarak tayin edilmiştir (Eşitlik 3.1.). Varyasyon katsayısı değerinin her üç derişim için de %2'den küçük olması önerilmektedir (234, 235).

$$\% \text{Geri Kazanım} = (\text{Tayin Edilen Derişim} / \text{Eklenen Derişim}) \times 100 \quad (3.1.)$$

Kesinlik (*Precision*)

Kesinlik, bir yöntemin birbirini izleyen ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik, yalnızca tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir; bu nedenle sayısal bir değeri yoktur. Bir analitik yöntemin kesinliği istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı derişimdeki örnekler art arda ölçülerek aritmetik ortalama, standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) hesaplaması ile değerlendirilir. Tekrar edilebilirlik (*repeatability*) ve tekrar elde edilebilirlik (*reproducibility*) kesinliğin ifade edilmesini sağlayan ölçütlerdir (234, 235).

- Tekrar Edilebilirlik (*Repeatability*)

Aynı derişimdeki siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein çözeltilerinden hareketle, aynı laboratuvar, aynı analist ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenmiştir. Stok çözeltiden 10 µg/mL ve 400 µg/mL (asetilsistein için 10 µg/mL ve 300 µg/mL) olacak şekilde düşük ve yüksek iki derişimde örnekler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile, siprofloksasin ve levofloksasin için 293 nm ve asetilsistein için 214 nm'de 6 kez ayrı ayrı okutulup, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için ortalama, SS ve VK hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin gösterilmesi için VK'nin %2'den küçük olması önerilmektedir (234, 235).

- Tekrar Elde Edilebilirlik (*Reproducibility*)

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır. Stok çözeltiden 10 µg/mL ve 400 µg/mL (asetilsistein için 10 µg/mL ve 300 µg/mL) olacak şekilde seyreltme yapılmış ve aynı derişimlerde 6 ayrı çözelti hazırlanmıştır. Çözeltilerin pik alanları HPLC ile, siprofloksasin ve levofloksasin için 293 nm ve asetilsistein için 214 nm’de elde edilerek, ortalama, SS ve VK hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin gösterilmesi için VK’nin %2’den küçük olması önerilmektedir (234, 235).

Özgüllük (*Specificity*)

Bir analitik yöntemin özgüllüğü; ortamda bulunan etkin maddenin, yardımcı maddeler, safsızlıklar veya parçalanma ürünleri varlığında analiz edilebilmesi ile değerlendirilir. Miktar tayini için kullanılan analitik yöntemin, sadece siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteine ilişkin olduğundan emin olmak için etkin maddelerin analizlerinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramlar incelenmiştir (234, 235).

Duyarlılık (*Sensitivity*)

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesine yönelik olarak saptanabilirlik ve tayin edilebilirlik sınırları incelenmiştir. Saptanabilirlik (*Limit of detection-LOD*), sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu derişimdir. Miktar tayini sınırı (*Limit of quantification-LOQ*) ise, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlikte tayin edilebileceği en düşük derişimdir. Bu değer sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu derişimdir (234, 235).

Dayanıklılık (*Stability*)

Analiz süresince kullanılan etkin maddenin dayanıklı olup olmadığının saptanabilmesi için yapılan bir validasyon ölçütüdür. Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin belirli bir derişimde hazırlanan çözeltileri, ölçüm süresince etkin maddelerin dayanıklılığının gösterilebilmesi için, 25°C’de bekletilerek değerlendirilmiştir. 400 µg/mL (asetilsistein için 300 µg/mL) derişimde hazırlanan

çözeltilerin absorpsanları, hazırlandığı anda, 4., 12. ve 24. saatlerde ölçülerek, derişimdeki değişim incelenmiştir. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (234, 235).

3.4. Dornaz Alfa Maddesinin Miktar Tayini

Dornaz alfa, enzim yapısında bir madde olduğu için miktar tayini, proteinlerin miktar tayininde kullanılan *Bicinchoninic Acid Assay* (BCA) yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla hazır BCA kiti kullanılmıştır. Reaktif karışımını hazırlamak için 50 kısım A ile 1 kısım B reaktifleri karıştırılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara 25 µL 1000, 800, 600, 400, 200 µg/mL derişimlerde dornaz alfa (Pulmozyme[®], 2,5 mg/2,5 mL) çözeltisi konulmuş (n=6), üzerlerine 200 µL reaktif karışımı eklenmiş, hafifçe 30 saniye çalkalanmış, 37°C’de 30 dk. inkübe edilmiş, plaka tekrar oda sıcaklığına gelinceye kadar beklenmiş ve VersaMax marka ELISA Microplate Reader (ABD) kullanılarak 562 nm’de ölçüm yapılmıştır. Dornaz alfa derişimine karşı BCA yönteminden elde edilen absorpsan değerleri ile kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Formülasyonlarda bulunan siprofloksasin ve levofloksasin maddeleri de yukarıda belirtilen şekilde hazırlanmış ve 562 nm’de absorpsan vermedikleri gösterilmiştir.

3.5. Kuru Toz İnhaler (KTİ) Hazırlama Yöntemi

Çalışmamızda siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotiklerinin, asetilsistein ve dornaz alfa mukolitikleri ile kombine, taşıyıcısız (*carrier-free*) KTİ formülasyonları hazırlanmıştır. En önemli amaç, alveollere kadar ulaşan formülasyonlar geliştirmek olduğu için, öncelikli olarak, üretilen tozların partikül büyüklüğünün 5 µm’den küçük olması hedeflenmiştir.

3.5.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında öncelikle siprofloksasinin %1,5 derişimde distile su içerisindeki çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti, Buchi Mini Spray Dryer B-290 (İsviçre) model püskürterek kurutma cihazı kullanılarak, 150°C giriş sıcaklığı, %5 pompa hızı, 667 L/sa gaz akış hızı, %80 aspiratör çekiliş koşullarında püskürtülüp kurutulmuştur. Elde edilen tozun partikül büyüklüğü dağılımı ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda 3,066 µm (d₁₀), 6,027 µm (d₅₀) ve 11,142 µm (d₉₀)

hacim çapı değerleri elde edilmiştir. Ulaşılan partikül boyutu 5µm'den büyük olduğu için bu yöntem uygun bulunmamıştır.

Mannitol ve siprofloksasinin %1 derişimde sulu çözeltileri hazırlanmış, yukarıda belirtilen koşullarda püskürtülüp kurutulmuştur. Partikül büyüklüğü dağılımı ölçülmüş, d_{10} değeri 5,947 µm, d_{50} değeri 18,803 µm, d_{90} değeri 84,846 µm olarak bulunmuştur. Elde edilen partikül boyutu 5µm'den büyük olduğu için bu yöntem de uygun bulunmamıştır.

Etkin maddenin *nonsolvent* ve organik çözücü varlığında püskürtülerek kurutulması ile, partikül boyutunun, sulu ortam ve çözen çözücü olması durumuna kıyasla küçüldüğü bilinmektedir (236, 237). Bu nedenle püskürterek kurutma aşamasında organik çözücü kullanılması uygun görülmüştür. Bu amaçla, ortam olarak izopropil alkol seçilmiştir. Siprofloksasin, izopropil alkolde çözünmediği için süspansiyonu hazırlanıp püskürtülerek kurutulmuştur. Levofloksasinin izopropil alkoldeki çözünürlüğü oldukça düşüktür, bu nedenle seyreltik levofloksasin çözeltisi hazırlanarak püskürterek kurutma işlemi uygulanmıştır.

Püskürterek kurutma işlemi sırasında, süspansiyon veya çözeltiler öncelikle damlacıklarına ayrılır, daha sonra oluşan her bir damlacık kuruyarak bir partikül oluşturur. Bu nedenle çözelti veya süspansiyonun katı içeriği ne kadar az olursa elde edilen partikül boyutu o kadar küçük olur. Ayrıca, püskürtülen süspansiyondan elde edilen tozun partikül büyüklüğü, süspansiyonun partikül büyüklüğünden küçük olamayacağı için, püskürterek kurutma öncesi süspansiyonların partikül büyüklüğü önemli bir parametredir. Bu amaçla önce bilyalı değirmen yöntemi ile öğütme yapılarak yaklaşık 2 µm partikül boyutuna sahip süspansiyonlar elde edilmesi hedeflenmiştir.

Siprofloksasin, Tablo 3.2.'deki koşullarda, izopropil alkol içerisinde disperse edilerek bilyalı değirmen (Retch, Almanya) ile öğütülmüş, her bir çalışmadan sonra partikül büyüklükleri ölçülmüştür.

Tablo 3.2. Ön formülasyon çalışmalarında siprofloksasinin bilyalı değirmen ile öğütülme koşulları.

Derişim (%)	0,5	300 rpm, 15 dk.
	1	
	2	
rpm	100	%1 derişim, 15 dk.
	200	
	300	
Süre (dk.)	15	%1 derişim, 300 rpm
	60	
	120	

Bilyalı değirmen yöntemi ile çalışılırken partikül büyüklüğünü etkileyen en önemli parametreler; dispersiyonun katı içeriği (derişim), haznenin dolayısıyla bilyaların dönme hızı (rpm) ve öğütme süresidir. Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, bu çalışma kapsamında en kritik parametrenin dönüş hızı (rpm) olduğu görülmüştür. Fakat 300 rpm dönüş hızına çıkıldığı halde istenilen partikül boyutuna ulaşamamıştır. Söz konusu cihaz ile daha yüksek rpm değerinde çalışmak mümkündür, fakat dönüş hızı arttıkça hazne içerisinde bilyaların sürtünmesi ile oluşan ısı artmaktadır. Etkin maddemiz antibiyotik olduğundan, maddelerin stabilitesi göz önünde bulundurularak, bilyaların dönüş hızının artırılması yoluna gidilmemiştir.

Bilyalı değirmen yöntemi ile yaklaşık 2 µm partikül boyutuna düşülemediği için tez çalışması kapsamında bilyalı değirmen, homojenizasyon ve püskürtük kurutma yöntemleri kombine olarak kullanılmıştır. Yüksek basınçlı homojenizatörün *chamber* parçasının tıkanmasını önlemek amacıyla bilyalı değirmen ile ön öğütme yapıp, sonrasında yüksek basınçlı homojenizatör ile solunabilir boyutta partiküller elde edilmiştir.

İzopropil alkol içindeki siprofloksasin süspansiyonu (%1) bilyalı değirmen ile 100 rpm, 60 dk. koşullarında öğütülmüş, d_{10} değeri 1,756, d_{50} değeri 5,230, d_{90} değeri 21,754 µm olarak bulunmuştur. Bu süspansiyon 20, 30, 40 ve 50 defa 20000 PSI basınç altında Microfluidics M-110P model homojenizatörden (ABD) geçirilmiş ve partikül boyutları ölçülmüştür. En küçük partikül boyutuna 40 defa homojenizasyon ile ulaşılmıştır ($d_{10}=0,082$ µm, $d_{50}=0,277$ µm, $d_{90}=1,450$ µm). Elde edilen partikül büyüklüğü, püskürtük kurutma aşamasına geçmek için uygun bulunmuştur.

3.5.2. Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında elde edilen veriler doğrultusunda Tablo 3.3.'te verilen antibiyotik:mukolitik oranlarına uygun olarak formülasyonlar üretilmiştir.

Tablo 3.3. Formülasyonların teorik antibiyotik (siprofloksasin ve levofloksasin) ve mukolitik (asetilsistein ve dornaz alfa) içerikleri.

KTİ	Antibiyotik içeriği (%)	Mukolitik tipi ve içeriği (%)
Siprofloksasin KTİ	100,0	-
Siprofloksasin-asetilsistein KTİ	90,4	Asetilsistein (9,6)
Siprofloksasin-dornaz alfa KTİ	76,5	*Pulmozyme® (23,5)
Levofloksasin KTİ	100,0	-
Levofloksasin-asetilsistein KTİ	90,4	Asetilsistein (9,6)
Levofloksasin-dornaz alfa KTİ	76,5	*Pulmozyme® (23,5)

*Pulmozyme®'in dornaz alfa içeriği %10'dur (w/w).

Bilyalı Değirmen Yöntemi

Siprofloksasin, siprofloksasin-asetilsistein, siprofloksasin-dornaz alfa formülasyonları için gerekli miktarda siprofloksasin balon jodelere alınıp izopropil alkol ile 200 mL hacme tamamlanmıştır. Bilyalı değirmende, 16 adet 20 mm çapında agat bilya kullanılarak, 100 rpm'de 60 dk. öğütülmüş, partikül büyüklükleri ölçülmüştür. Bu işlem sonucunda 25 µm'den küçük partikül boyutu elde etmek yeterli bulunmuştur.

Levofloksasin, levofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-dornaz alfa formülasyonları için gerekli miktarda levofloksasin balon jodelere alınıp 200 mL hacme izopropil alkol ile tamamlanmıştır. Siprofloksasin formülasyonları için kullanılan yöntemle aynı koşullar altında bilyalı değirmenden geçirilmiş, partikül boyutu ölçülmüştür. Homojenizatörde kullanılan *chamber*'in porlarının tıkanmasını engellemek amacıyla ön öğütme yapılmıştır.

Homojenizatör Yöntemi

Bu aşamada, siprofloksasin içeren formülasyonlar için, yaklaşık 2 µm boyutunda siprofloksasin partikülleri içeren süspansiyonlar elde etmek amaçlanmıştır. Levofloksasin için ise, levofloksasinin izopropil alkolde çözünürlüğü düşük olduğundan, homojenizasyon işlemi çözünürlüğü artırmak, çözünme süresini kısaltmak ve berrak çözelti elde etmek amacıyla uygulanmıştır.

Siprofloksasin, siprofloksasin-asetilsistein ve siprofloksasin-dornaz alfa formülasyonları için, bilyalı değirmenden elde edilen siprofloksasin süspansiyonu 1:2 oranında izopropil alkol ile seyreltilmiştir. 20.000 PSI'da, 40 defa homojenizatörden geçirilmiştir.

Levofloksasin, levofloksasin-asetilsistein ve levofloksasin-dornaz alfa formülasyonları için, bilyalı değirmenden elde edilen levofloksasin süspansiyonu 1:2 oranında izopropil alkol ile seyreltilmiştir. 20.000 PSI'da, çözünene kadar (10 defa) homojenizatörden geçirilmiştir.

Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma yönteminden sonra 1-5 µm çapında partiküller elde etmek amaçlanmıştır.

Sadece siprofloksasin içeren formülasyon için, homojenizatörden elde edilen siprofloksasin süspansiyonu Tablo 3.4.'te verilen koşullarda, manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken, püskürtülerek kurutulmuştur.

Siprofloksasin-asetilsistein formülasyonu için, homojenizatörden elde edilen siprofloksasin süspansiyonuna 50 mL izopropil alkol içerisindeki asetilsistein çözeltisi eklenmiş, manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Elde edilen karışım Tablo 3.4.'te verilen koşullarda, manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken, püskürtülerek kurutulmuştur.

Siprofloksasin-dornaz alfa formülasyonu için, homojenizatörden elde edilen siprofloksasin süspansiyonuna dornaz alfa yani Pulmozyme® piyasa preparatı eklenmiş, manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiştir.

Elde edilen karışım Tablo 3.4.'teki koşullarda, manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken, püskürtülerek kurutulmuştur. Pulmozyme® preparatı içerisinde su bulunduğu için, etkili bir kurutma sağlamak amacıyla, giriş sıcaklığı diğer formülasyonlardan farklı olarak 85°C değil 90°C olarak seçilmiştir.

Sadece levofloksasin içeren formülasyon için, homojenizatörden elde edilen levofloksasin çözeltisi, etkin madde oranı %0,25 (a/h) olacak şekilde izopropil alkol ile seyreltilip, Tablo 3.4.'teki koşullarda püskürtülerek kurutulmuştur.

Levofloksasin-asetilsistein formülasyonu için, homojenizatörden elde edilen levofloksasin çözeltisine 50 mL izopropil alkol içerisindeki asetilsistein çözeltisi eklenmiş, etkin madde oranı %0,25 (a/h) olacak şekilde izopropil alkol ile seyreltilmiş, manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Elde edilen karışım Tablo 3.4.'teki koşullarda püskürtülerek kurutulmuştur.

Levofloksasin-dornaz alfa formülasyonu için, homojenizatörden elde edilen levofloksasin çözeltisine dornaz alfa yani Pulmozyme® piyasa preparatı eklenmiş, karışım etkin madde oranı %0,25 (a/h) olacak şekilde izopropil alkol ile seyreltilmiş, manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Elde edilen karışım Tablo 3.4.'teki koşullarda püskürtülerek kurutulmuştur. Pulmozyme® preparatı içerisinde su bulunduğu için, etkili bir kurutma sağlamak amacıyla, giriş sıcaklığı diğer formülasyonlardan farklı olarak 85°C değil 90°C olarak seçilmiştir.

Tablo 3.4. Püskürterek kurutma yöntemi koşulları.

Formülasyon	Giriş Sıcaklığı (°C)	Pompa (%)	Hava akışı (q-flow) L/sa	Aspiratör (%)
Siprofloksasin	85	5	667	-40
Siprofloksasin - Asetilsistein	85	5	667	-40
Siprofloksasin - Dornaz alfa	90	5	667	-40
Levofloksasin	85	5	667	-40
Levofloksasin - Asetilsistein	85	5	667	-40
Levofloksasin - Dornaz alfa	90	5	667	-40

Fiziksel Karışım

Siprofloksasin ve asetilsistein 9,5:1 (a/a) oranında, bir porselen kapsül içinde porselen spatülle tekdüze olacak şekilde karıştırılarak fiziksel karışım elde edilmiştir.

Levofloksasin ve asetilsistein 9,5:1 (a/a) oranında, bir porselen kapsül içinde porselen spatülle tekdüze olacak şekilde karıştırılarak fiziksel karışım elde edilmiştir.

Dornaz alfa, Pulmozyme® piyasa preparatı içinde çözelti olarak bulunduğu için fiziksel karışımı hazırlanmamıştır.

3.6. Kuru Toz İnhaler Formülasyonları Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

3.6.1. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR)

Siprofloksasin, siprofloksasin-asetilsistein, siprofloksasin-dornaz alfa, levofloksasin, levofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-dornaz alfa formülasyonlarının FT-IR spektrumları, Bölüm 3.2.2.'de belirtilen koşullar kullanılarak elde edilmiştir.

3.6.2. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Analizi (DSC)

Siprofloksasin, siprofloksasin-asetilsistein, siprofloksasin-dornaz alfa, levofloksasin, levofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-dornaz alfa formülasyonlarının DSC analizleri; siprofloksasin ve levofloksasin içeren formülasyonlar için sırasıyla 25°C–350°C, 25°C–250°C sıcaklık aralığında, Mettler Toledo DSC (İsviçre) cihazı kullanılarak, Bölüm 3.2.3.'te belirtilen koşullar kullanılarak yapılmıştır.

3.6.3. Formülasyonların Termogravimetrik Analizi (TGA)

Siprofloksasin, siprofloksasin-asetilsistein, siprofloksasin-dornaz alfa, levofloksasin, levofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-dornaz alfa formülasyonlarının TGA analizi, Bölüm 3.2.4.'te belirtilen koşullar kullanılarak yapılmıştır.

3.6.4. Formülasyonların X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)

Siprofloksasin, siprofloksasin-asetilsistein, siprofloksasin-dornaz alfa, levofloksasin, levofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-dornaz alfa formülasyonlarının XRD analizleri, Bölüm 3.2.5.'te belirtilen koşullar kullanılarak elde edilmiştir.

3.6.5. Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi (SEM)

Formülasyonların SEM görüntüleri, Bölüm 3.2.6.'da belirtilen koşullar kullanılarak elde edilmiştir.

3.6.6. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

Malvern Mastersizer Hydro 2000S cihazı kullanılarak, hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımları analiz edilmiştir. Formülasyon geliştirme aşamasında siprofloksasin, siprofloksasin-asetilsistein, siprofloksasin-dornaz alfa formülasyonları için, bilyalı değirmen yöntemi, homojenizasyon yöntemi ve püskürterek kurutma yönteminden sonra elde edilen partiküllerin büyüklük dağılımı Malvern Mastersizer Hydro 2000S cihazı ile analiz edilmiştir. Bilyalı değirmen ve homojenizasyon yöntemi ile elde edilen süspansiyonlar, obskürasyon değeri 5-15 arasında olacak şekilde cihazın haznesine damlatılmış, 1750 rpm karıştırma hızı ile ultrason uygulanmaksızın ölçüm yapılmıştır. Püskürterek kurutma yönteminden elde edilen siprofloksasin ve levofloksasin içeren KTİ'lerin, uygun miktarda izopropil alkoldeki dispersiyonları hazırlanmış ve partikül büyüklüğü dağılımları yukarıda belirtilen şekilde ölçülmüştür. Levofloksasinin izopropil alkolde düşük bir çözünürlüğü olduğu için, levofloksasine doyurulmuş izopropil alkol içerisinde ve dispersiyon hazırlanır hazırlanmaz (~1 dk.) ölçüm yapılmıştır.

3.7. Formülasyonların Antibiyotik ve Mukolitik İçeriklerinin Tayini

Siprofloksasin içeren formülasyonlardan 10'ar mg tartılmış, ayrı ayrı balon jöjelerde mobil faz ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltiler, Bölüm 3.3.'te belirtilen koşullar kullanılarak HPLC ile analiz edilmiş ve formülasyonlardaki siprofloksasin ve asetilsistein miktarı bulunmuştur. Deney her formülasyon için 3 defa tekrarlanmıştır.

Levofloksasin içeren formülasyonlardan 5'er mg tartılmış, ayrı ayrı balon jodelerde mobil faz ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltiler, Bölüm 3.3.'te belirtilen koşullar kullanılarak HPLC ile analiz edilmiş ve formülasyonlardaki levofloksasin ve asetilsistein miktarı bulunmuştur. Deney her formülasyon için 3 defa tekrarlanmıştır.

Dornaz alfa içeren formülasyonlardaki dornaz alfa içeriği, formülasyonların teorik olarak 250 ppm dornaz alfa içerecek şekilde çözeltilerinin hazırlanarak Bölüm 3.4'te belirtilen koşullar altında absorbans değerlerinin saptanması ve Bölüm 3.4.'te elde edilen kalibrasyon doğrusunun kullanılması ile hesaplanmıştır (n=6).

3.8. Çözünürlük Tayini

Siprofloksasin pH'ya bağımlı çözünürlük gösterdiğinden (238), mukolitik ajan varlığında çözünürlüğünün değişip değişmediğini incelemek amacıyla formülasyonlar içindeki siprofloksasin için çözünürlük deneyi yapılmıştır. Referans olarak ise işlem görmemiş siprofloksasin ile çözünürlük deneyi yapılmıştır.

Çözünürlük deneyi, çözünme ortamında yani pH 6,4 (ftalat) tamponunda yapılmıştır. Kistik fibrozis hastalığında akciğer pH'sının, sağlıklı durumdaki fizyolojik pH'ya göre daha asidik olduğu (pH 6,0-7,0), literatür verilerinden saptandığı için, bu koşulları daha doğru yansıtması amacıyla ortam pH'sı 6,4 olarak belirlenmiştir (239, 240). Preparat, oral olarak kullanılmadığından, pH 1,2, 4,5 ve 6,8'de çözünürlük deneyleri yapılmamıştır.

Yatay çalkalayıcının sıcaklığı termostatla $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ve devir hızı 80 rpm (devir/dk)'e ayarlanmıştır. Ölçüm yapılacak her saat için (1, 6 ve 24. saat) kapaklı tüpler kullanılmıştır. Bu amaçla, 20 mL'lik kapaklı tüplere 30 mg siprofloksasin veya 30 mg siprofloksasin içerecek şekilde formülasyonlar konulmuş, üzerine 15 mL çözünme ortamı eklenmiştir. Kapaklı tüpler yatay çalkalayıcıya yerleştirilmiş, belirlenen zaman aralıklarında (1, 6 ve 24. saat) 1,5 mL örnek alınmış ve örnekler süzülmüştür. Her bir örnek üç defa HPLC ile analiz edilmiştir. Bu işlem 3 tüp için de yapılmıştır. HPLC analizi yapılarak siprofloksasinin çözünürlüğü saptanmıştır.

3.9. Çözünme Deneyi

Siprofloksasin ve levofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonları için yayımlanmış resmi bir çözünme ortamı veya koşulu olmadığından, literatürde yapılan çalışmalardan yararlanılmıştır (241).

Çözünme deneylerinde 75,69 mg siprofloksasine ve 130 mg levofloksasine karşılık gelen kuru toz inhaler formülasyonları kullanılmıştır (242). Çözünme deneyi $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'de, aygıt II (pedal) kullanılarak, 300 mL pH 6,4 tamponunda, 75 rpm dönme hızıyla yapılmıştır.

Literatürde çözünme ortamı olarak, dilpalmitoilfosfatidil kolin gibi yüzey etkin maddeler, *phosphate buffered saline* (PBS) içinde hazırlanılıp kullanılmıştır. Fakat ön çalışmalarımız siprofloksasinin fosfat gruplarıyla etkileştiğini göstermiştir, bu nedenle siprofloksasin için fosfat grubu içeren ortamlar kullanılmamıştır (243). Ayrıca maddelerimizin çözünürlüğü, yüzey etkin madde kullanımını gerektirmeyecek kadar yüksek olduğu için yüzey etkin madde içeren ortamlar tercih edilmemiştir. Yüzey etkin madde içeren ortamların tekrarlanabilirliği zor ve tamponlama kapasiteleri düşüktür (241). Siprofloksasin ve levofloksasin maddeleri pH'ya bağımlı çözünürlük gösterdiği için tamponlama kapasitesi yüksek ortamlar tercih edilmiştir (238, 244). Çözünme deneyi için, kistik fibrozis hastalığında akciğer pH'sını iyi şekilde temsil ettiği ve tamponlama kapasitesi yüksek olduğu için pH 6,4 tamponu çözünme ortamı olarak seçilmiştir. Siprofloksasin içeren formülasyonlar için ftalat, levofloksasin içeren formülasyonlar için fosfat tamponu kullanılmıştır.

Çözünme tayini, Sotax çözünme tayini cihazı kullanılarak yapılmıştır. Çözünme ortamından 5., 10., 15., 30., 45., 60., 90. dakikalar ve 2., 3., 4., 6., 8., 10., 12. ve 24. saatlerde 2'şer mL örnek alınmış ve aynı miktardaki taze ortam çözünme ortamına ilave edilmiştir. Alınan örneklerde, çözünen antibiyotik miktarlarının yüzdesi hesaplanmıştır. Deney, formülasyon ve kontrol grupları için 3 kez tekrarlanmıştır.

Çözünme deneyi siprofloksasin, siprofloksasin-asetilsistein, siprofloksasin-dornaz alfa formülasyonları ile yapılmıştır. Levofloksasin içeren formülasyon ve işlem görmemiş levofloksasin ile de çözünme deneyi yapılmış (n=3), her iki koşulda da 15

dk.'da levofloksasinin %95'i çözüldüğü için levofloksasin içeren diğer formülasyonlar (levofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-dornaz alfa) ile çözünme deneyi yapılmamıştır. Her bir kuru toz inhaler formülasyonu ve işlem görmemiş siprofloksasin ve levofloksasin için, çözünen siprofloksasin ve levofloksasin değerlerinin yüzdeleri, zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

Çözünme sürelerinin hesaplanması aşamasında, Weibull eşitliği kullanılmıştır (Eşitlik 3.2.) (245).

$$\log [- \ln (1 - m)] = b \log (t) - \log a \quad (3.2.)$$

“m”, çözünen fraksiyonu ifade etmektedir ve t zaman noktasında çözünen maddenin toplam madde miktarına oranlanması ile hesaplanmıştır. Her zaman noktası için hesaplanan $\log [- \ln (1 - m)]$ değerleri, $\log(t)$ 'ye karşı grafiğe geçirilerek doğru denklemi elde edilmiştir. $[- \ln (1 - m)]$ değerinin 1 olduğu noktada “m” değeri 0,63212'dir. Elde edilen grafiklerden, etkin maddenin %63,2'sinin çözünmesi için gerekli süre (T_c) hesaplanmıştır (Eşitlik 3.3.).

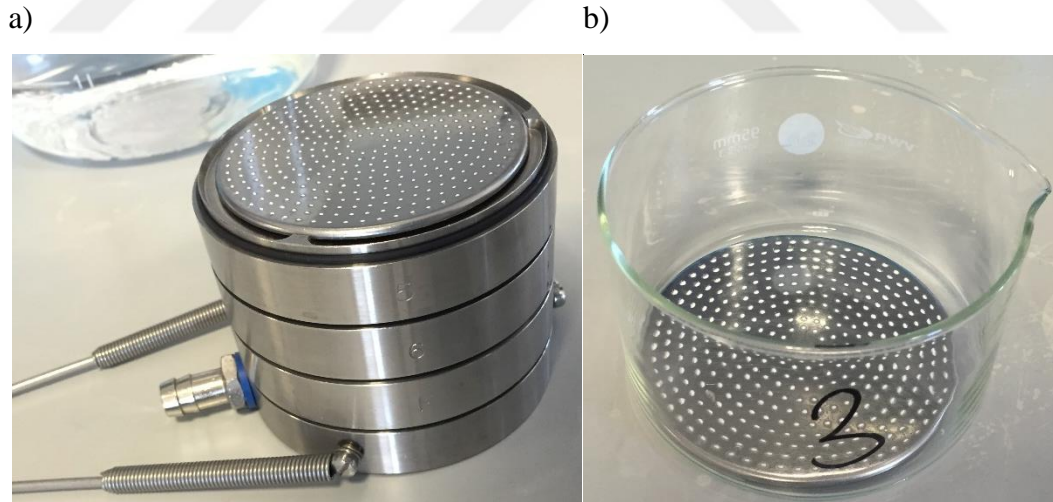
$$a = (T_c)^b \quad (3.3.)$$

Bu durum da çözünme verilerinin başarıyla karşılaştırılabilmesini sağlamaktadır.

3.10. Formülasyonların Anderson Cascade Impactor ile Aerodinamik Ölçütlerinin Hesaplanması

Formülasyonların aerodinamik parametreleri, USP 38 kriterleri göz önünde bulundurularak, *Andersen Cascade Impactor* (ACI) (Copley Scientific, Nottingham, İngiltere) cihazı kullanılarak hesaplanmıştır. ACI cihazı temel olarak, kauçuk ağızlık, indüksiyon aygıtı (*induction port*), 8 adet ACI aşaması ve filtre parçalarından oluşmaktadır. Cihazın tüm parçaları ayrılmış, partiküllerin cihazın her aşamasında bulunan plakalara tutunmasını sağlamak için Tween 20'nin etanol içerisindeki %1 (a/h)'lik çözeltisi ile ACI plakaları kaplanmış ve kurumaları için yeterli süre beklenmiştir. Cihaz parçaları bir araya getirilmiş, son aşamada vakum pompası da cihaza bağlanmıştır. Formülasyonlar, aynı miktarda (27,9 mg) antibiyotik baz içerecek şekilde *size 3* HPMC kapsüllerine (Capsugel, Colmar, Fransa) doldurulmuş,

dolu kapsüller Aerolizer® tasarımında olan RS01 inhaler aygıtının (Plastiapa SpA, İtalya) kapsül haznesine yerleştirilmiştir. Aygıt kapatılmış, tartılmış ve yanlarda bulunan butonlara basılarak kapsülün delinmesi sağlanmıştır. Her bir ACI analizi için 3 adet kapsül kullanılmıştır. Aygıt ACI cihazının ağızlık parçasına takılmıştır. Cihaz 60 L/dk. hava akış hızıyla, inhalerden 4 L hava akışını sağlayacak şekilde 4 saniye süre ile aktive edilmiştir. Bu aşamada süre kontrolü için zaman ayarlayıcı, akış hızının kontrolü için ise kalibre edilmiş elektronik dijital akış ölçer kullanılmıştır. Cihaz kapatıldıktan sonra partiküllerin yerleşmesi için 30 saniye beklenmiştir. İnhaler aygıtı, kapsül çıkarılmadan önce tartılmış ve başlangıç tartımı ile aradaki fark hesaplanarak aygıtı terk eden KTİ miktarı hesaplanmıştır. Cihaz bu şekilde 2 defa daha çalıştırılmış, her defasında tartılarak gerekli hesaplar yapılmıştır. İnhaler aygıtı, kapsül, kauçuk ağızlık, indüksiyon aygıtı, tüm ACI cihazındaki basamaklar ve filtre, mobil faz ile ayrı ayrı yıkanarak balon jöjelerin içerisine alınmış, böylece bu kısımlarda tutunan formülasyonlar ayrı ayrı elde edilmiştir (Şekil 3.1.). Her bir deney 3 defa tekrarlanmış ve elde edilen örnekler HPLC ile analiz edilmiştir. İşlem sırasında ortamın sıcaklık ve nem değerleri de ölçülmüştür.



Şekil 3.1. a) İşlem sonrası ACI cihazında, 5 numaralı aşama plakasında tutulan toz,
b) İşlem sonrası 3 numaralı plaka ve yıkanmak üzere alındığı cam kap.

Emitted dose (ED), yani inhaler aygıtını terk eden doz; indüksiyon aygıtı, ACI basamakları ve filtreden elde edilen antibiyotik miktarı olarak tanımlanmış ve bu tanıma göre hesaplanmıştır. *Emitted dose* yüzdesi, *emitted dose*'un, yüklenen antibiyotik dozuna oranlanması ile elde edilmiştir. Kütle ortalama aerodinamik çap

(KOAÇ), aerodinamik çapın (log skalası) fonksiyonu olarak kümülatif yüzde antibiyotik miktarı (olasılık skalası) grafiğinden elde edilmiştir. İnce partikül dozu (İPD) aerodinamik çapı 5 µm'den küçük mikropartikül miktarı olarak hesaplanmıştır. İnce partikül fraksiyonu (İPF), İPD ile ED'nin birbirine oranı alınarak hesaplanmıştır.

3.11. Etkin Madde ve Formülasyonlara İlişkin Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonlardan etkin maddenin permeabilite (geçirgenlik) çalışması hücre kültürü kullanılarak yapılmıştır. İlacın akciğerden permeabilitesini incelemek için, akciğer epitel hücrelerini çok iyi taklit eden Calu-3 hücreleri ile hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.11.1. Calu-3 Hücrelerinin Çözülmesi ve Çoğaltılması

Pasaj sayıları 28-32 arasında olan Pulmoner epitel Calu-3 hücreleri (HTB-55-ATCC) permeabilite deneylerinde kullanılmıştır. Calu-3 hücreleri -180°C azot tankından alınarak kuru buza konulmuştur. Dondurulmuş Calu-3 içeren vial, 37°C su banyosuna batırılarak biraz sıvılaşması beklenmiştir. Laminar akış kabini içinde, Calu-3 içeren vial, tüpteki kültür ortamı üzerine tek seferde hızlıca boşaltılmıştır. 1000 rpm'de 3 dk. santrifüjlendikten sonra üstte kalan kısım atılmıştır. Çöken hücreler taze kültür ortamında (%10 fetal bovine serum (FBS) ve %0,5 penisilin/streptomisin içeren DMEM-Ham F-12) tekrar süspand edilip 25 cm²'lik hücre kültürü kabına aktarılmıştır. Calu-3 hücreleri 37°C'de, nemli havada, %5 CO₂ içeren atmosferde inkübe edilmiştir.

3.11.2. Pasajlama

Hücreleri kaldırmak için %0,25 tripsin-EDTA çözeltisi kullanılmıştır. Hücre kültür kaplarındaki (flask) kültür ortamı atıldıktan sonra hücreler pH 7,4 *Phosphate buffered saline* (PBS) ile bir kez yıkanmıştır. Daha sonra flasklar, %0,25 tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 10-15 dk. süreyle inkübatörde tutulmuştur. Tripsinin etkisini inhibe etmek için tripsin-EDTA içerisindeki hücre süspansiyonu bekleme süresi sonunda besleme ortamı içeren tüpe eklenmiştir. Hücre süspansiyonu 1:3 oranında pasajlanarak yeni kültür kaplarına alınmış, inkübatörde çoğalmaya bırakılmıştır.

3.11.3. MTT Yöntemi ile Calu-3 Hücrelerinin Canlılığının Değerlendirilmesi

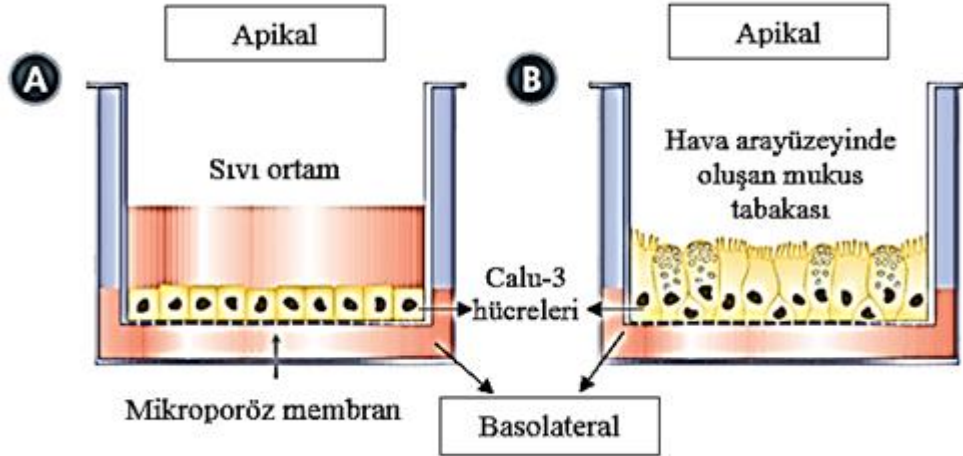
MTT hücre canlılık testi in vitro koşullarda hücrelerin canlılığına dayanarak ölçüm yapan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte formazan kristalleri oluşmaktadır. Formazan kristalleri, dimetil sülfoksit (DMSO) ve izopropanol gibi organik çözücülerde çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, derişime bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir. Böylece dolaylı olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmektedir (246).

Tripsinize edilen Calu-3 hücreleri kuyucuk başına 100 µL DMEM-Ham F-12 içinde 5000 hücre düşecek şekilde tripan mavisi ile sayılarak kuyucuklara eklenmiş ve tutunmaları için 24 saat beklenmiştir. Ertesi gün 100 µg/mL ve 500 µg/mL derişimde DMEM-Ham F-12 içinde hazırlanan örnekler 100 µL hacimde 96 kuyucuklu plakalara n=6 olacak şekilde uygulanmıştır. Plakalar 24 saat boyunca 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 25 µL MTT (5 mg/mL) çözeltisi kuyucuklara ilave edilmiş ve 4 saat 37°C'de bekletilip, süre sonunda ortam uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek 570 nm'de (kontrol amacıyla 450 ve 490 nm'lerde) absorbanslar mikropilaka okuyucu ile okunmuştur.

3.11.4. Geçiş Çalışmaları İçin Hücrelerin Hazırlanması

Pasaj sayısı 28-32 arasında olan Calu-3 hücre süspansiyonları 12 kuyucuklu (1,13 cm²) insertlere (0,4 µm) tripan mavisi ile sayım yapıldıktan sonra 5x10⁵ hücre/cm² (247) olacak şekilde ekilmiştir. Apikale 0,5 mL ve bazolaterale 1,5 mL büyüme ortamı eklenmiştir. Plakalar 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli havada inkübe edilmiştir. Hava arayüzeyinde hücre kültürü (AIC) oluşturmak için inkübasyondan 10 gün sonra apikal yüzdeki sıvı çekilmiş, sadece bazolateral yüzde ortam bırakılmış ve 10 gün de bu şekilde inkübe edilmiştir (248). Sıvıya gömülü hücre kültürü (LCC) oluşturmak için aynı şekilde inkübasyona devam edilmiştir. Ortam gün aşırı

değiştirilmiş, uygun TEER değerlerine ulaşıldıktan sonra permeabilite çalışmaları AIC ve LCC hücre kültürleri için ayrı ayrı yapılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. A) Sıvıya batık (LCC) ve B) hava arayüzeyinde (AIC) büyütülmüş Calu-3 hücrelerinin şematik gösterimi.

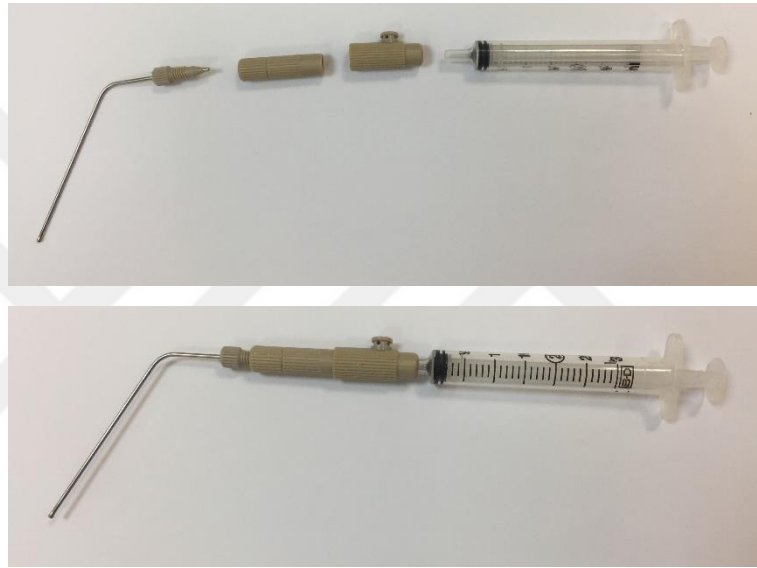
3.11.5. Calu-3 Hücrelerinin Bütünlüğünün Transepitel Elektriksel Rezistans (TEER) Ölçümü ve Inverted Mikroskop Görüntüleri ile Değerlendirilmesi

TEER ölçümü volt-ohm metre kullanılarak insertin üst ve alt kısımlarına elektrot yerleştirilerek yapılır. TEER değeri, kültür zamanı ile tipik olarak artar. Calu-3 hücre tek tabakalarının TEER değerleri Millicell-ERS epitel volt-ohm metre ile ölçülmüştür. Kültür ortamındaki hücrelerin görüntüleri, çevrik (*inverted*) mikroskop kullanılarak çekilmiştir.

3.11.6. Geçiş Çalışmaları

Tez kapsamında etkin maddelerin (siprofloksasin ve levofloksasin) permeabilitesi incelenmiştir. Bu amaçla Calu-3 hücreleri uygun şekilde (sıvıya batık – LCC, hava arayüzeyinde – AIC) çoğaltıldıktan sonra, formülasyonlar ve fiziksel karışımlar ayrı ayrı apikal yüzeylere (AIC için hava arayüzeyine) çözelti olarak uygulanmış; akciğerlerde alveollere ulaşan fraksiyonu temsil ettiği düşünülen partikül boyutuna (5 μm) sahip formülasyonlar ve fiziksel karışımlar ise kuru toz olarak uygulanmıştır. Transport ortamı olarak 10 mM HEPES içeren HBSS tamponu kullanılmıştır. Çözelti olarak uygulanan formülasyonlar ve fiziksel karışımlar, 250 $\mu\text{g/mL}$ (0,65 mM) siprofloksasin, 430 $\mu\text{g/mL}$ (1,161 mM) levofloksasin içeren

derişimlerde 500 µL olarak her bir kuyucuğa eklenmiştir. Kuru toz olarak uygulanan formülasyonlar ve fiziksel karışımlar 3,7 mg siprofloksasin ve levofloksasin içerecek şekilde tartılarak uygulanmıştır. Formülasyonların kuru toz olarak uygulanması aşamasında Dry Powder Insufflator™ for Rat-Model DP-4-R aygıtı kullanılmıştır (Şekil 3.3.). Söz konusu aygıt aracılığıyla tozun hava ile aerosolize olması sağlanmış, elde edilen sonuçların *in vivo* koşulları daha iyi taklit etmesi amaçlanmıştır. Dry Powder Insufflator™ aygıtı 1-5 mg aralığında toz ile kullanılabilirdiği için, yapılan ön denemeler sonucunda belirtilen miktar seçilmiştir.



Şekil 3.3. Dry Powder Insufflator™ for Rat – Model DP-4-R aygıtı.

Formülasyonlar uygulandıktan 2 saat sonra bazolateralde alınan örnekler HPLC ile analiz edilerek derişim değerleri hesaplanmıştır. Bu aşamada etkin maddeler için geliştirdiğimiz HPLC miktar tayini yöntemleri ile elde edilen doğru denklemlerinden yararlanılmıştır. Bazolateralde bulunan ortam hacmi bilindiğinden (1,5 mL) derişimden yola çıkılarak geçiş yapan antibiyotik miktarı hesaplanmıştır. Etkin maddeler için görünür permeabilite katsayısı (P_{app}) aşağıdaki formülle (Eşitlik 3.4.) hesaplanarak formülasyonların permeabilite değerleriyle karşılaştırılmıştır (196).

$$P_{app} = \frac{\text{Transport Hızı}}{\text{Hücre kültürü yüzey alanı} \times \text{Başlangıç derişimi}} \quad (3.4.)$$

3.11.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama±standart sapma (SS) veya ortalama±standart hata (SH) olarak verilmiştir. Partikül büyüklüğü verilerinin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Analizler IBM SPSS Statistics Versiyon 23 programı kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farkın önemliliği, elde edilen p değerinin α yanılma düzeyinden büyük ($p>\alpha$; istatistiksel olarak anlamsız) veya küçük ($p<\alpha$; istatistiksel olarak anlamlı) olmasına göre değerlendirilmiştir. Analitik yöntem için ise validasyon ölçütlerinin varyasyon katsayısı (VK) değerleri hesaplanmıştır.

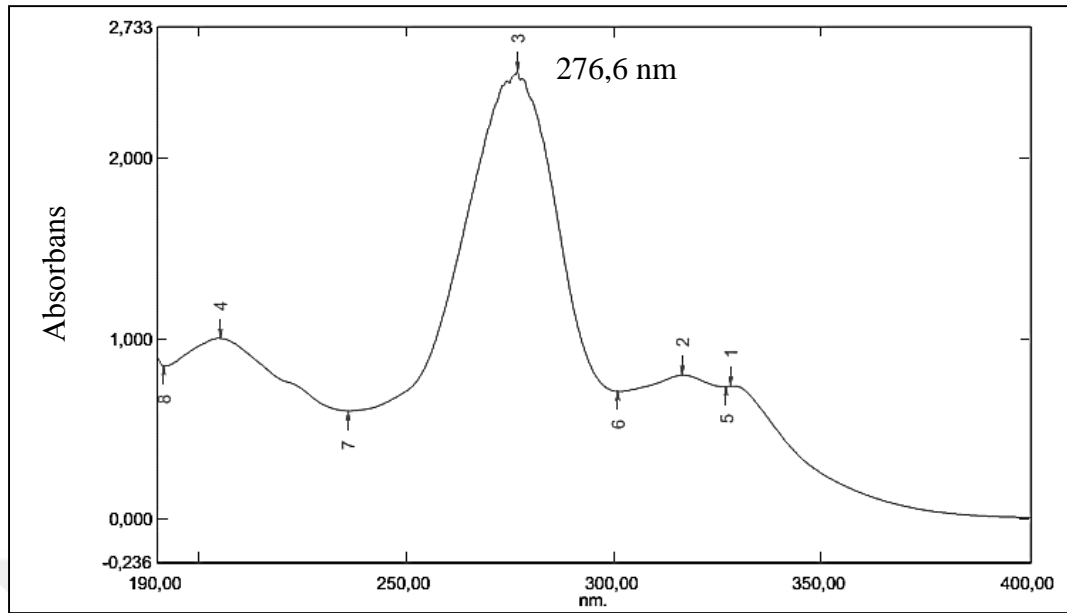


4. BULGULAR

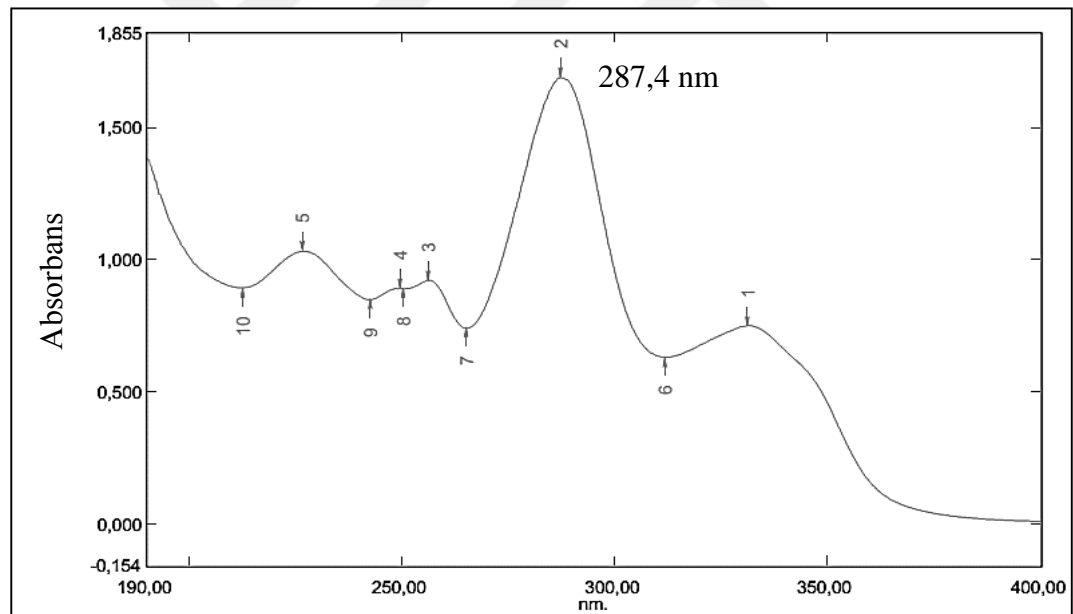
4.1. Etkin Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

4.1.1. Siprofloksasin, Levofloksasin, Asetilsistein ve Dornaz alfanın UV Spektrumu

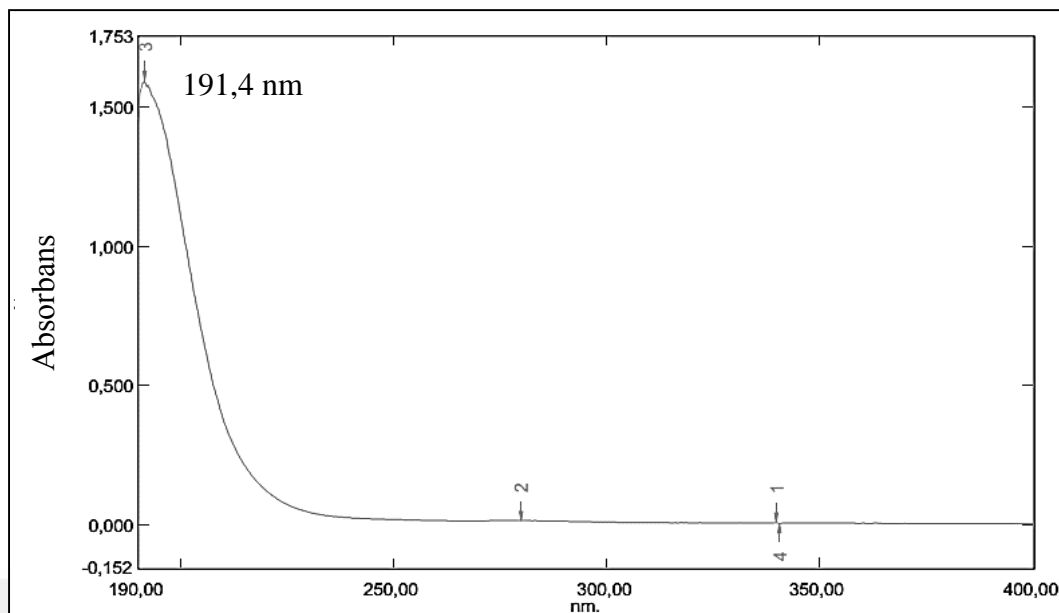
Siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ve dornaz alfa maddelerinin 25 µg/mL derişimlerdeki çözeltilerinin UV spektrumlarından, maksimum dalga boylarının, sırasıyla, 276,6 nm, 287,4 nm, 191,4 nm ve 192,0 nm olduğu tespit edilmiş; elde edilen verilerin literatür bilgileri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.-Şekil 4.4.).



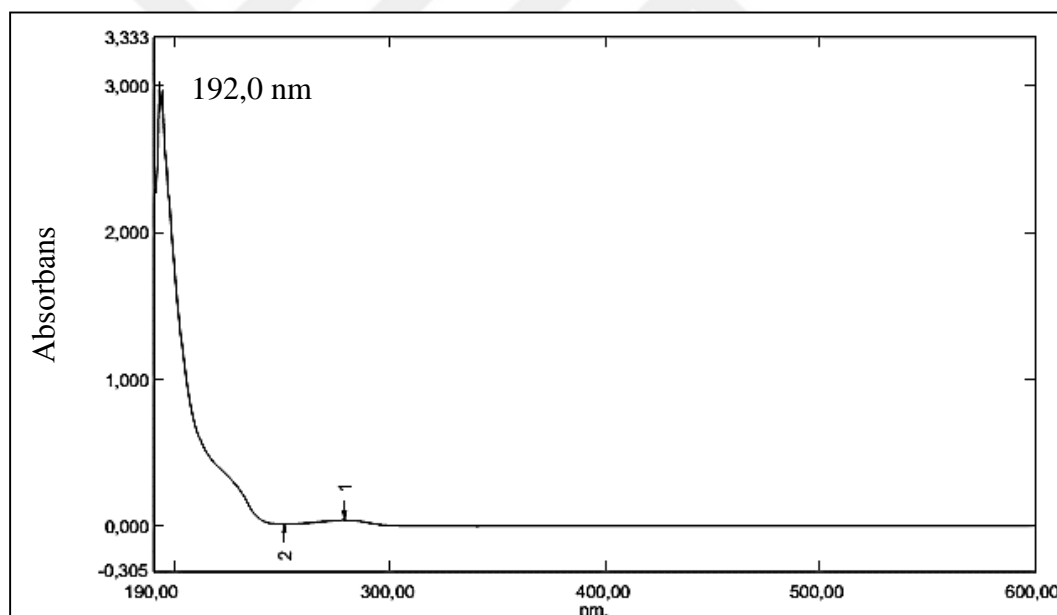
Şekil 4.1. Siprofloksasinin UV spektrumu (25 µg/mL).



Şekil 4.2. Levofloksasinin UV spektrumu (25 µg/mL).



Şekil 4.3. Asetilsisteinin UV spektrumu (25 µg/mL).

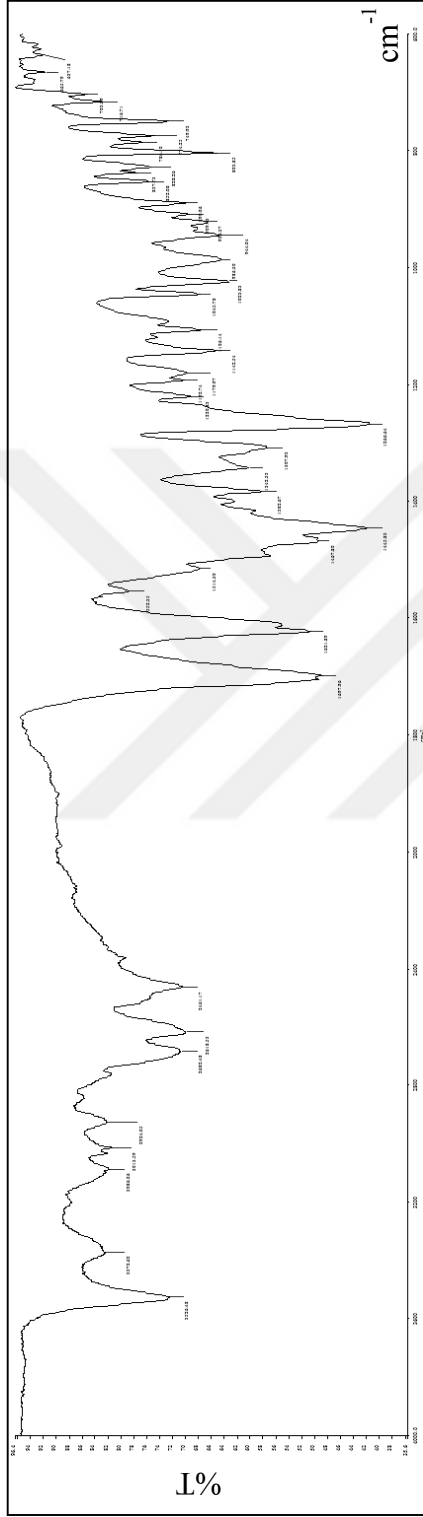


Şekil 4.4. Dornaz alfanın UV spektrumu (25 µg/mL).

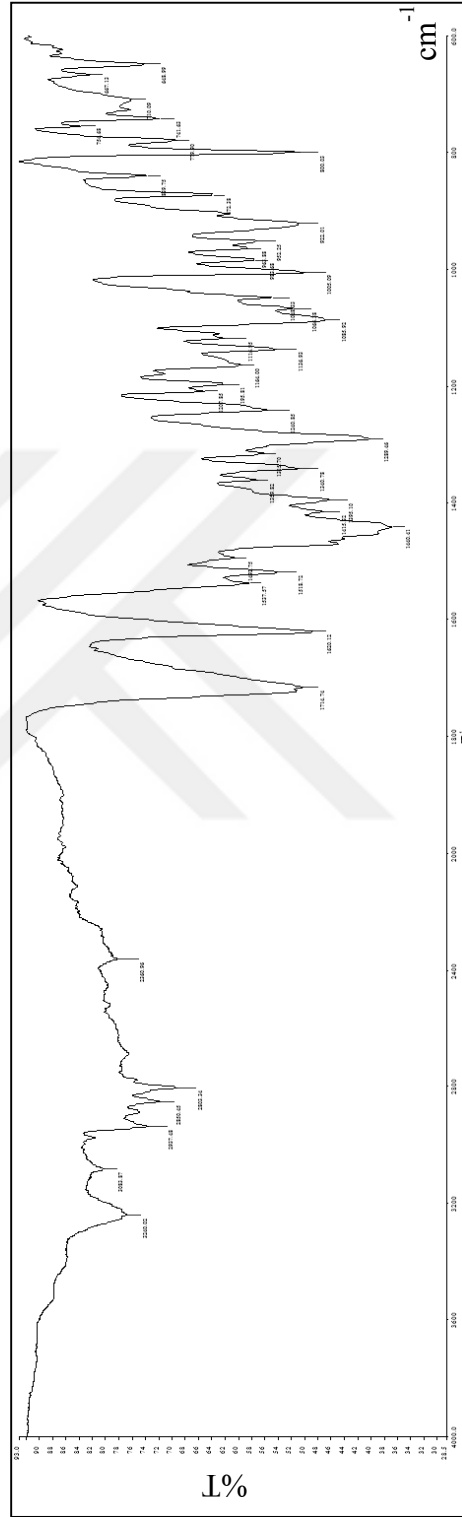
4.1.2. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin FT-IR Spektrumu

FT-IR spektrofotometresinde $4000-600\text{ cm}^{-1}$ dalga sayıları arasında kaydedilen bulgular Şekil 4.5.-Şekil 4.9.'da verilmiştir. Elde edilen spektrumlar literatür ile uyumludur (249-251).

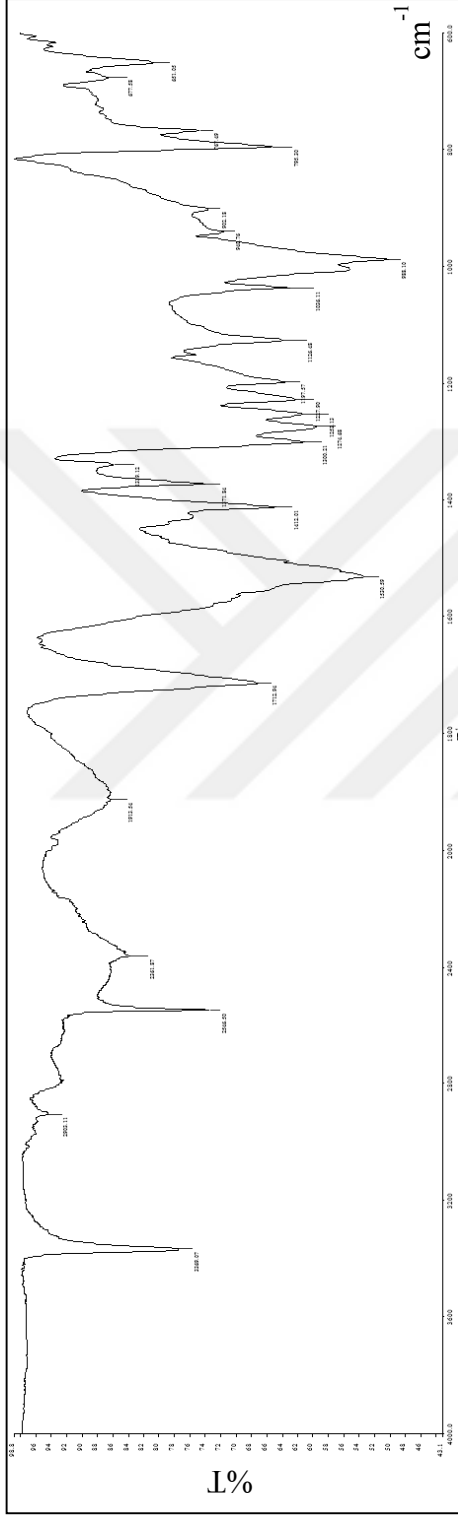




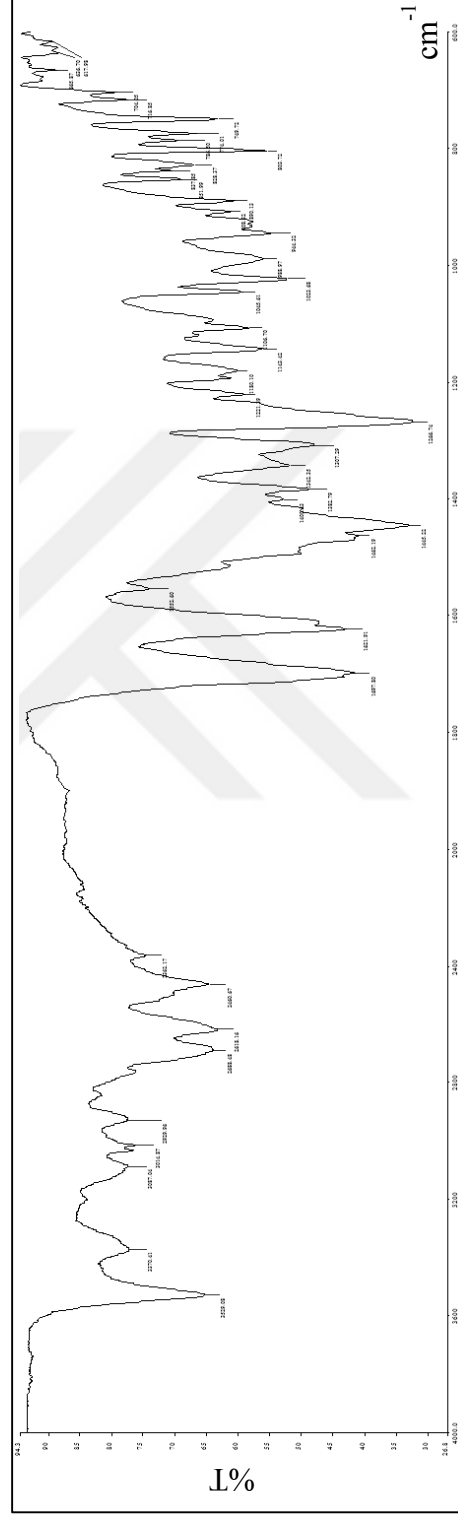
Şekil 4.5. Siprofloksasinin FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim (*transmittance*)).



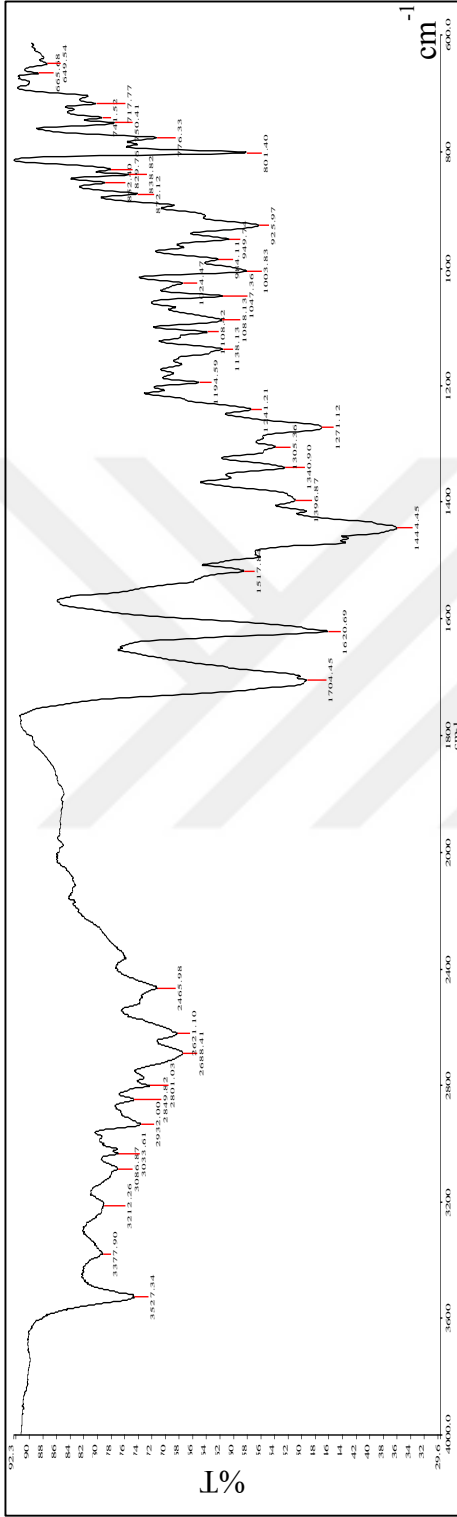
Şekil 4.6. Levofloksasinin FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).



Şekil 4.7. Asetilsisteinin FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).



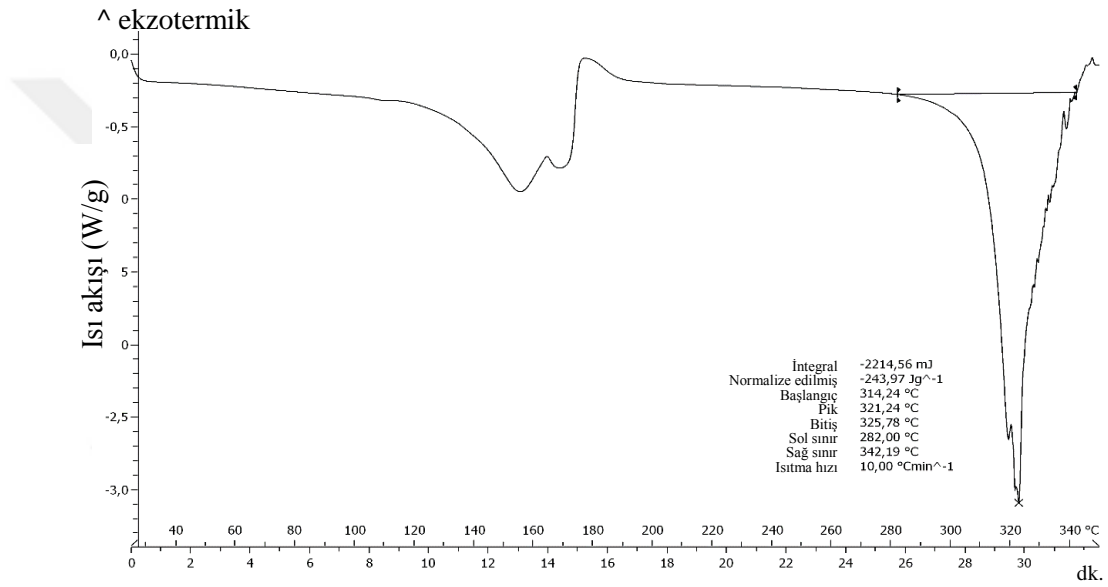
Şekil 4.8. Siprofloksasin ve asetilsistein maddelerinin fiziksel karışımının FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).



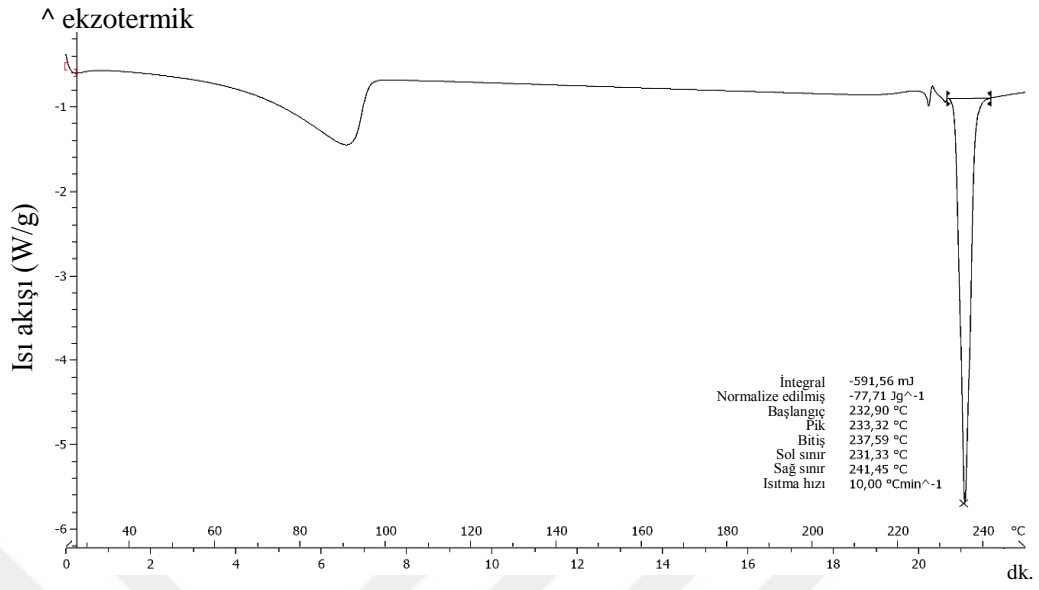
Şekil 4.9. Levofloksasin ve asetilsistein fiziksel karışımının FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm⁻¹) fonksiyonu olarak % iletim).

4.1.3. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Analizi (DSC)

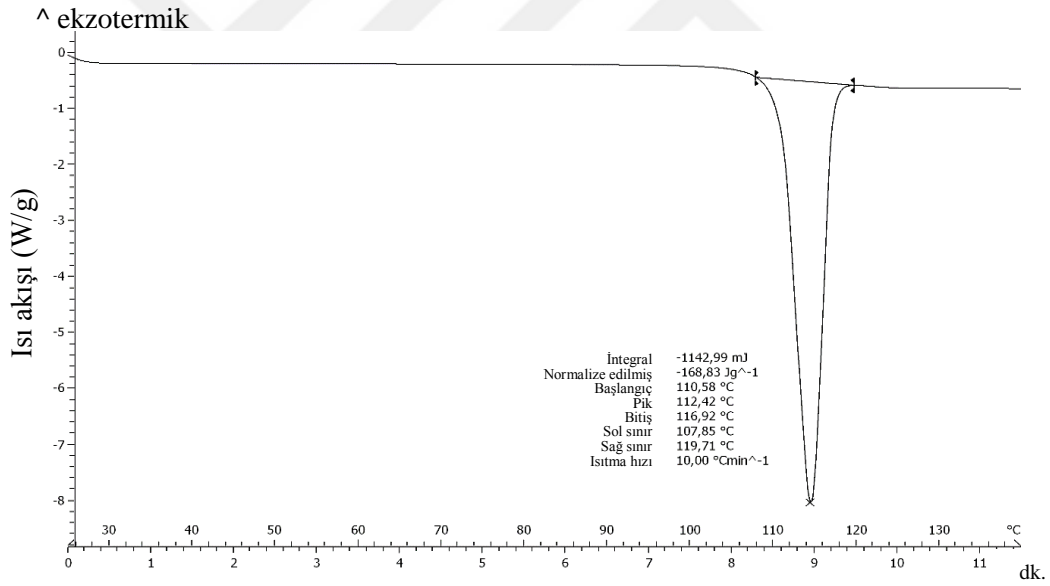
İşlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ve siprofloksasin-asetilsistein ile levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımları için elde edilen DSC termogramlarının literatürde verilen değerlerle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin erime noktaları 321,24°C, 233,32°C, 112,42°C olarak bulunmuştur ve sonuçlar literatür bilgisi ile uyumludur (Şekil 4.10.-Şekil 4.14.) (252-255).



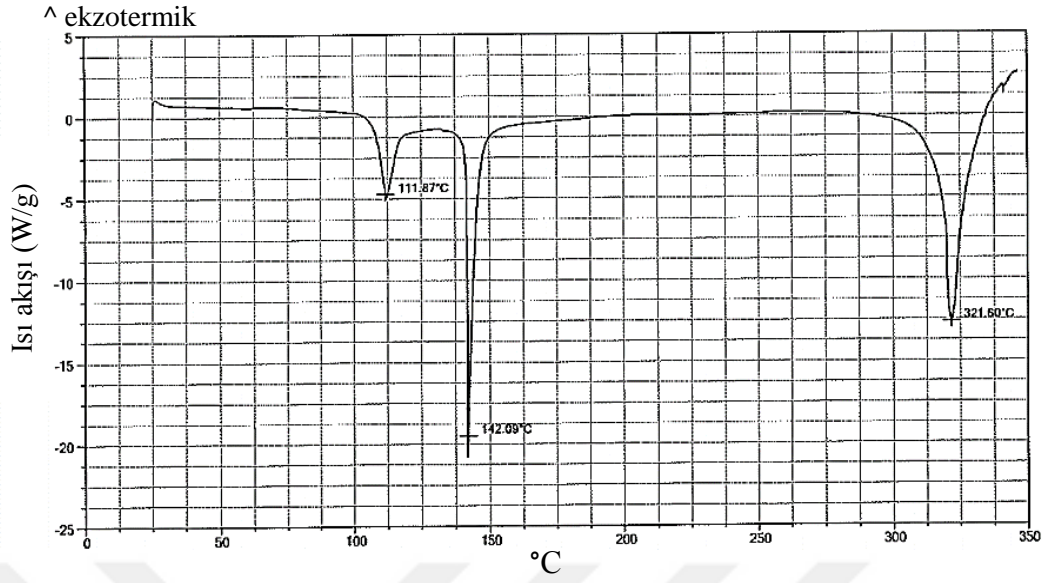
Şekil 4.10. Siprofloksasinin DSC analizi ile elde edilen termogram.



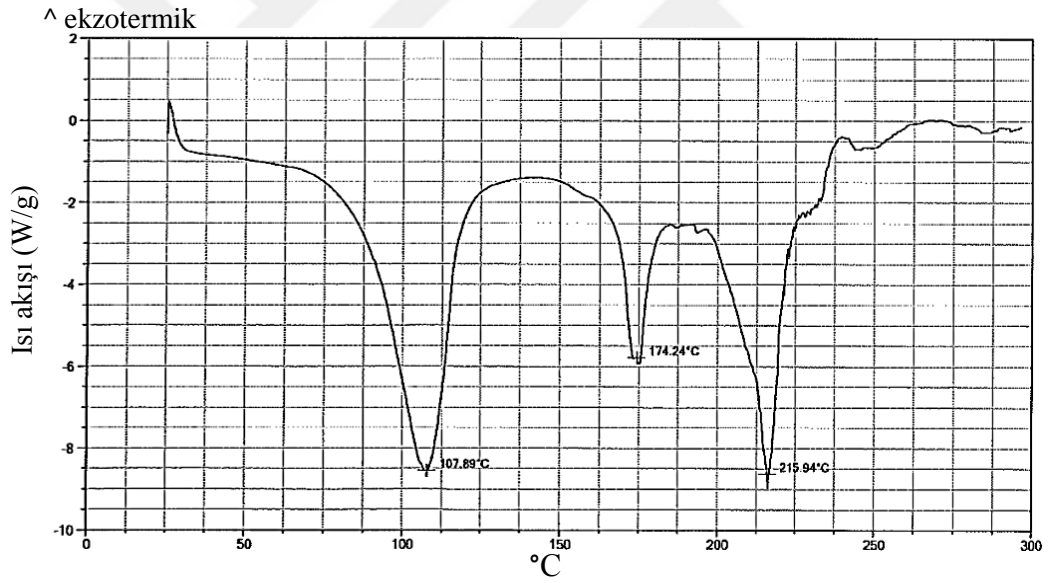
Şekil 4.11. Levofloksasinin DSC analizi ile elde edilen termogram.



Şekil 4.12. Asetilsisteinin DSC analizi ile elde edilen termogram.



Şekil 4.13. Siprofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımının DSC analizi ile elde edilen termogram.



Şekil 4.14. Levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımının DSC analizi ile elde edilen termogram.

4.1.4. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Termogravimetrik Analizi (TGA)

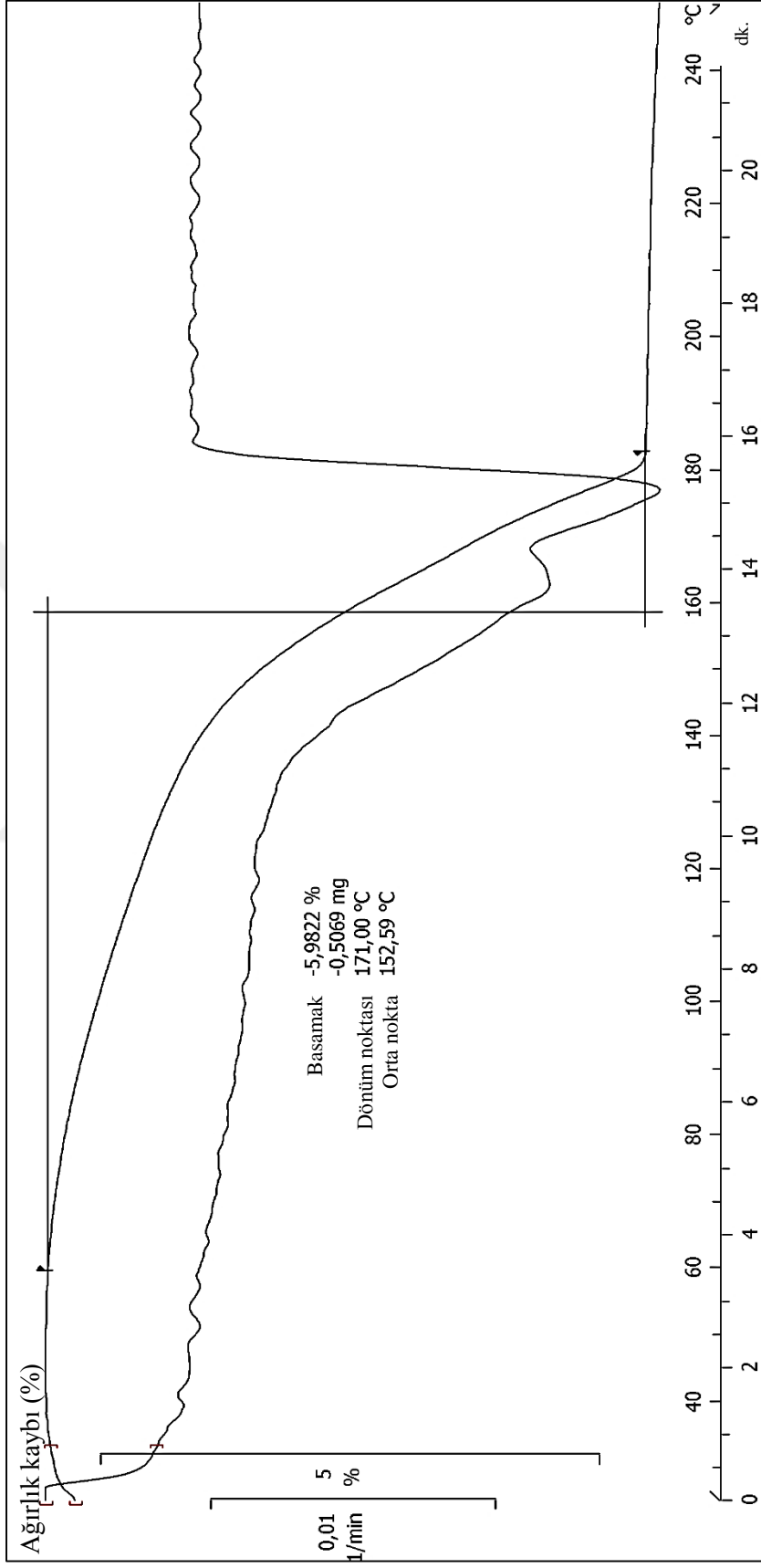
İşlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteine ait, TGA analizi sonuçları Tablo 4.1.'de ve Şekil 4.15.-Şekil 4.17.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. İşlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteine ait, TGA analizi sonucunda ölçülen ağırlık kaybı değerleri (ortalama±standart sapma (SS), n=3).

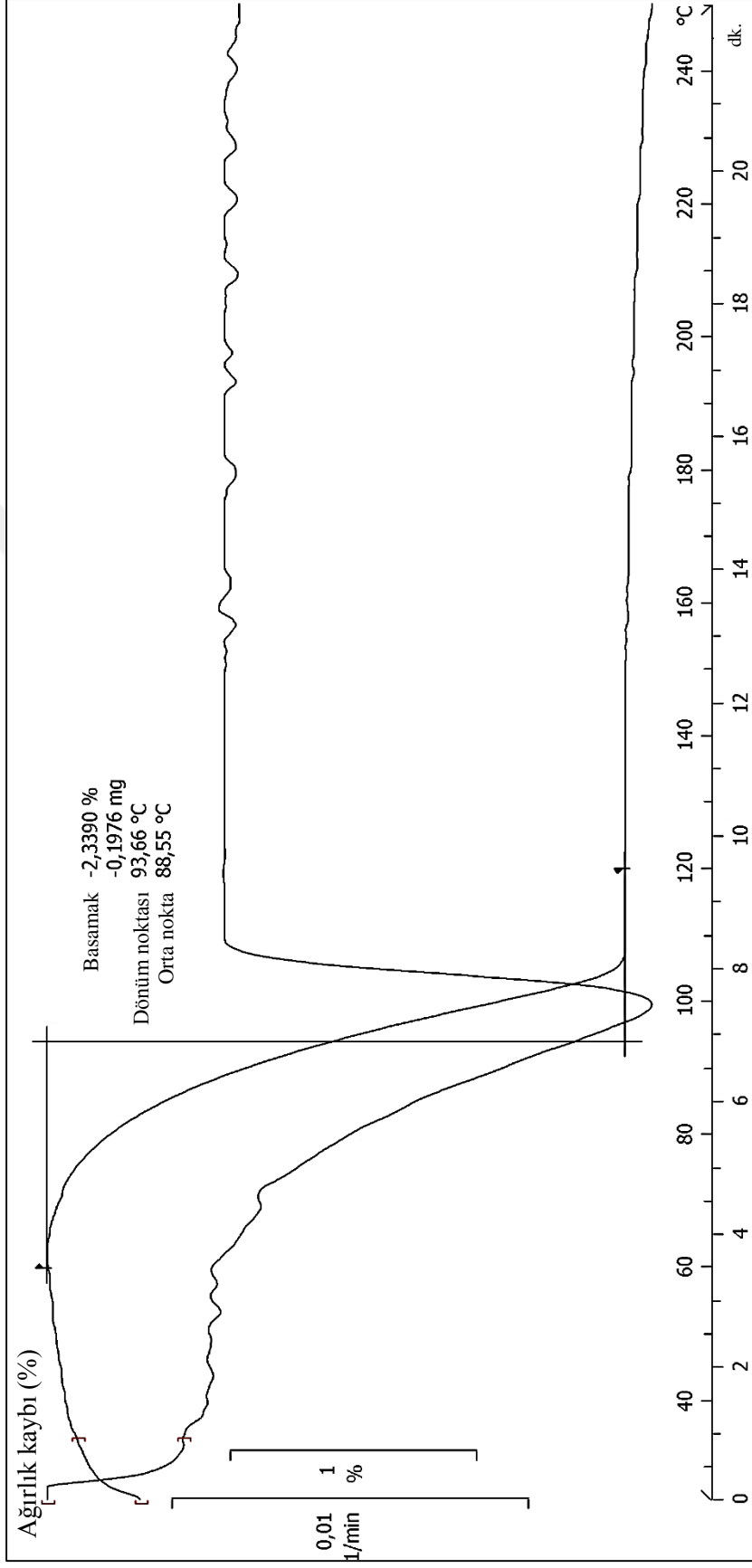
	Ağırlık kaybı (%)
İşlem görmemiş siprofloksasin	5,968±0,026
İşlem görmemiş levofloksasin	2,326±0,024
İşlem görmemiş asetilsistein	TSA*

*TSA: Tayin sınırının altında

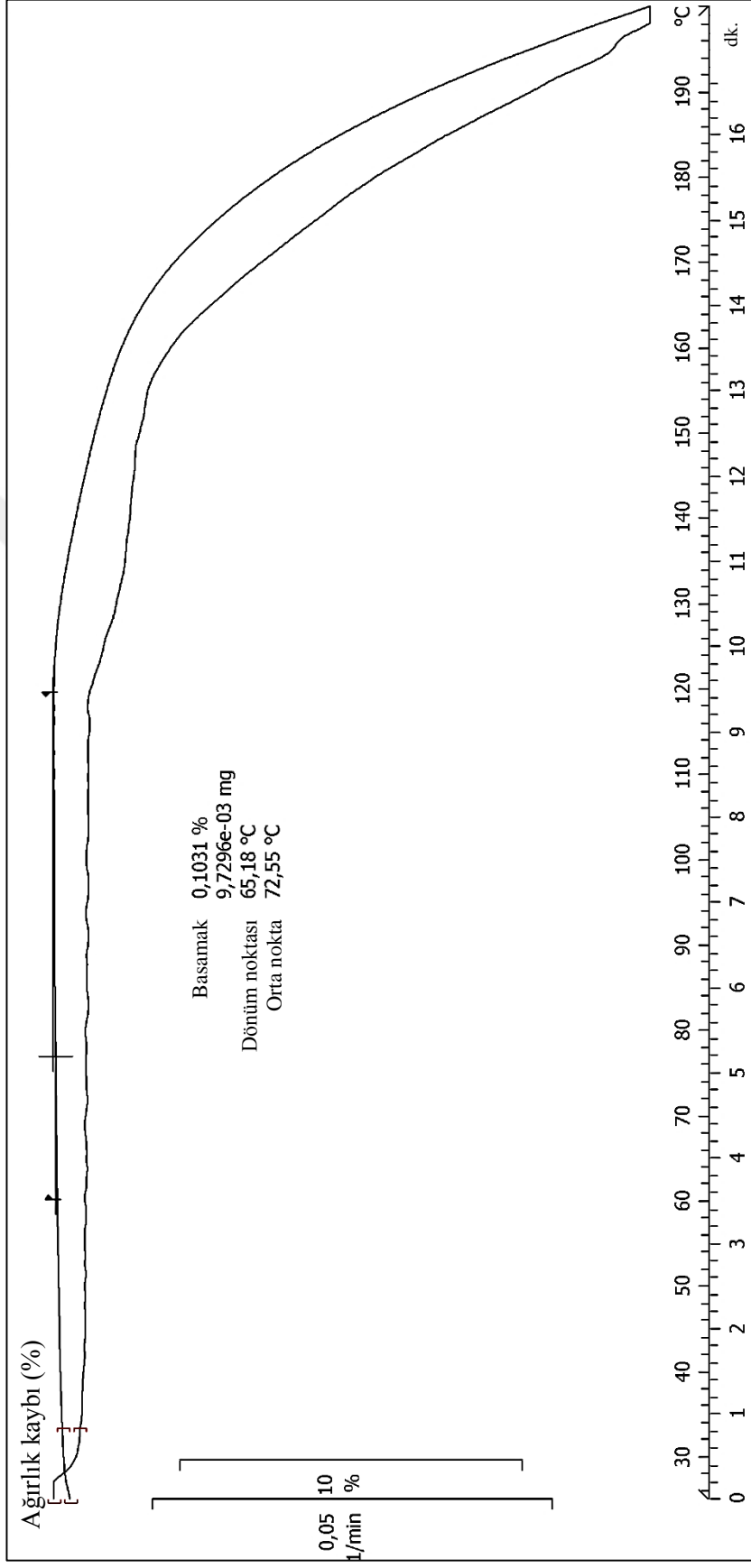
TGA analizi sonuçları incelendiğinde, işlem görmemiş siprofloksasinin % 5,968, işlem görmemiş levofloksasinin % 2,326 oranında neme sahip olduğu, işlem görmemiş asetilsisteinin nem içeriğinin ise tayin sınırının altında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.15. İşlem görmemiş siprofloksasinin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.



Şekil 4.16. İşlem görmemiş levofloksasinin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.

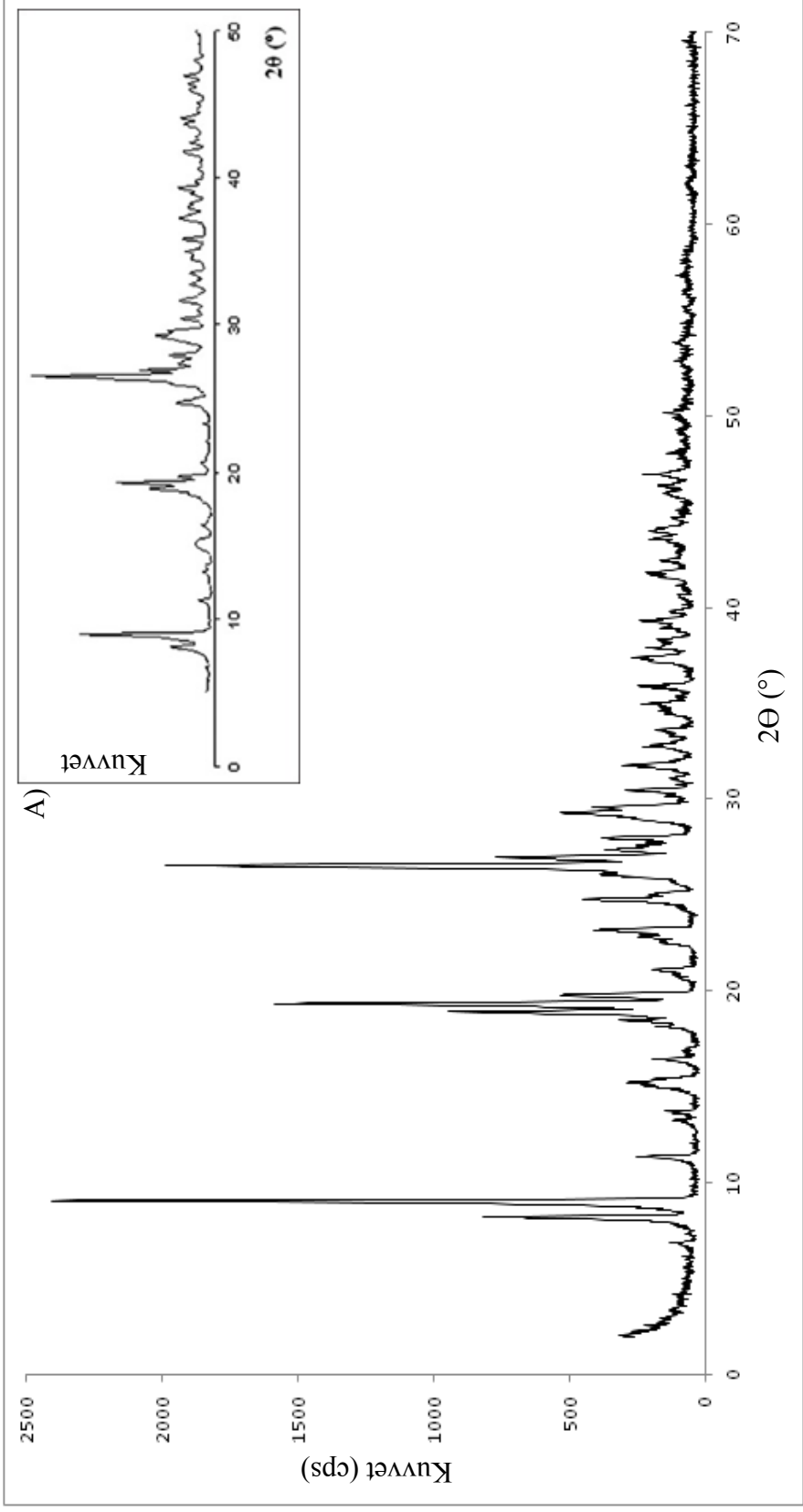


Şekil 4.17. İşlem görmemiş asetilsisteinin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.

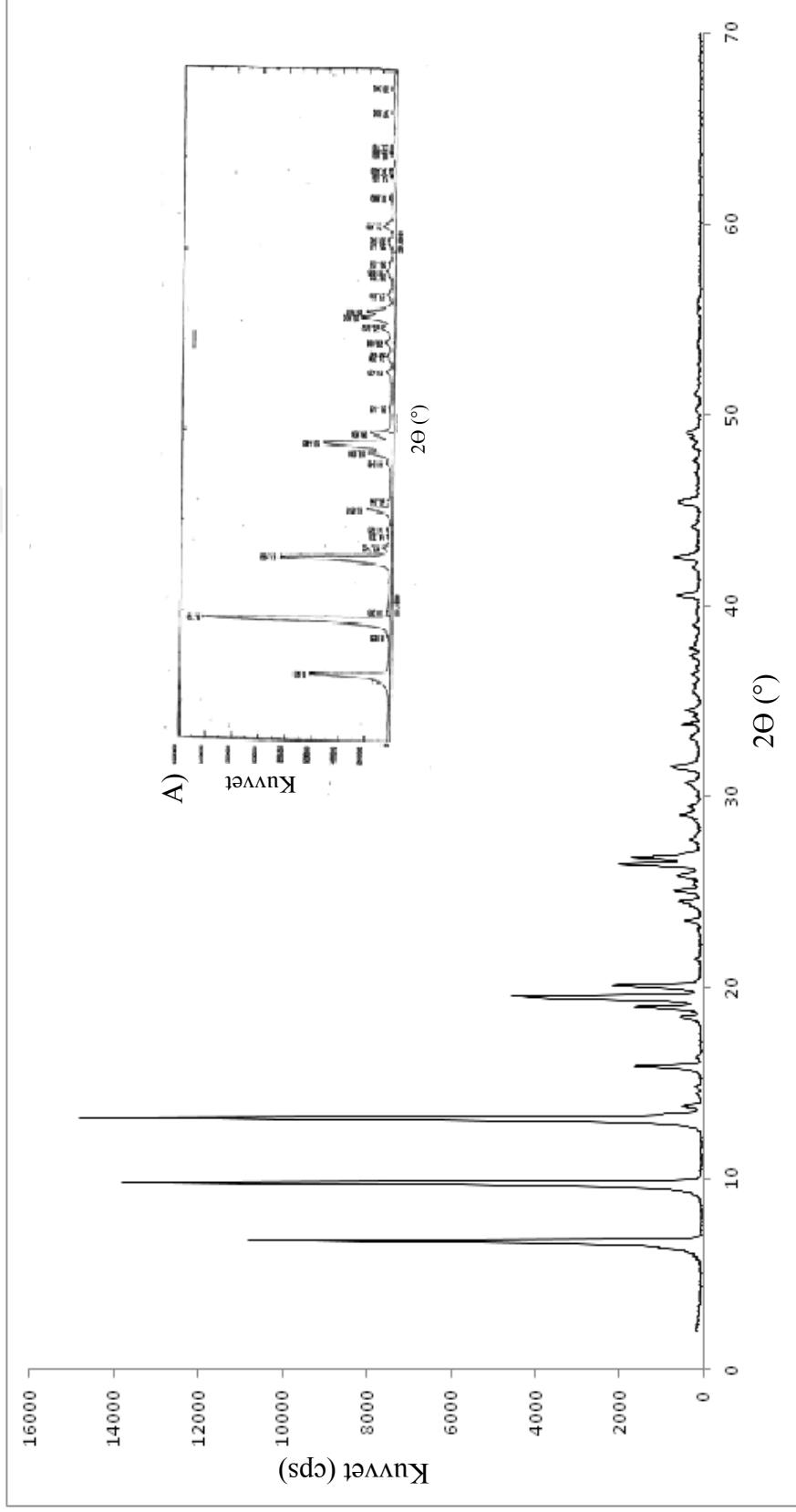
4.1.5. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)

İşlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ve siprofloksasin-asetilsistein ile levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımlarının XRD difraktogramları ve literatürdeki etkin maddelere ait XRD difraktogramları Şekil 4.18.-Şekil 4.22.'de verilmiştir. XRD difraktogramında piklerin görülmesi kristal yapı varlığını gösterir. Amorf yapı varlığında ise, XRD difraktogramında herhangi bir pik gözlenmemektedir. Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin kristal yapıda olduğu difraktogramlarda açık bir şekilde görülmektedir.

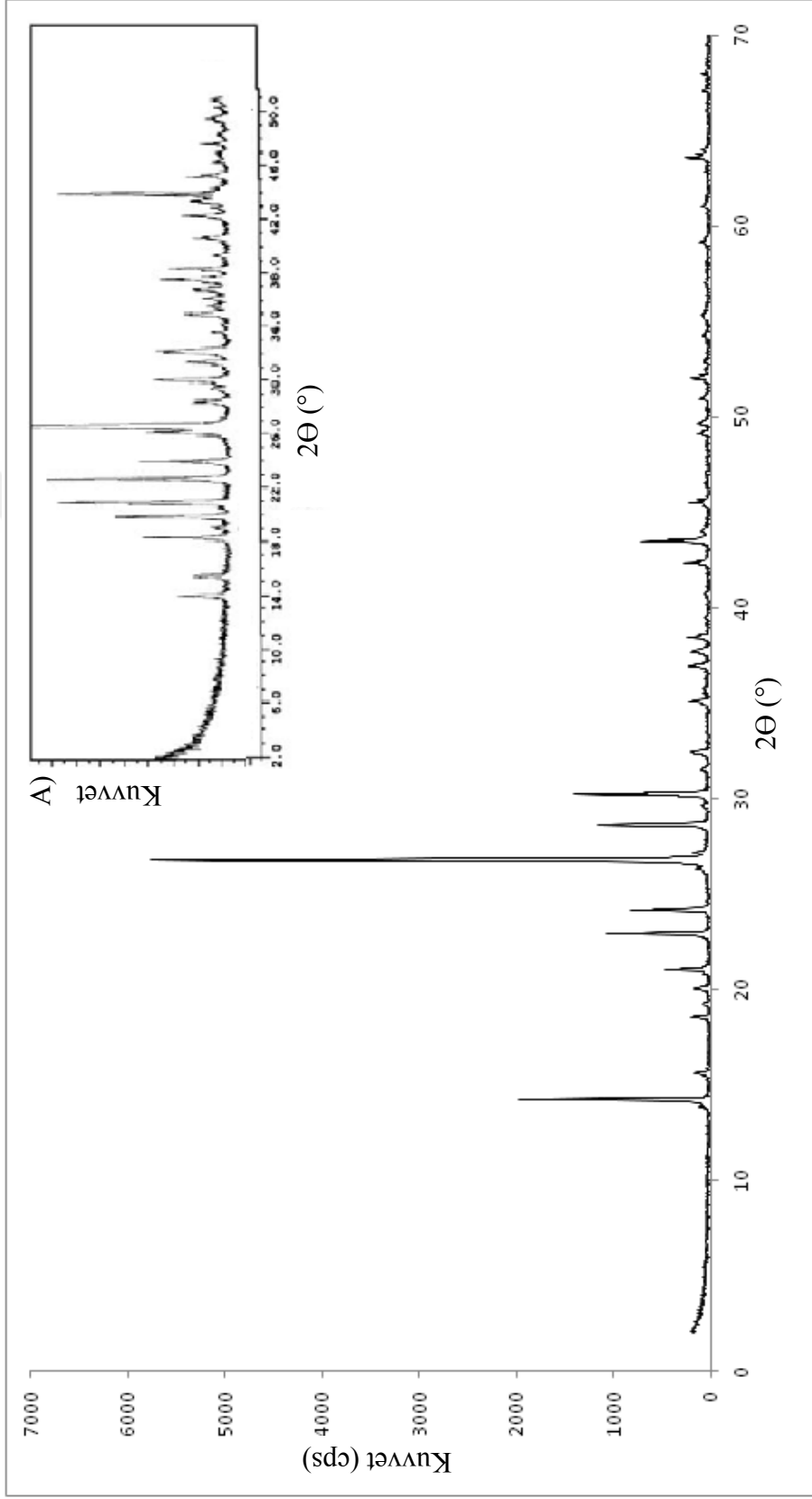
Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin XRD difraktogramları literatürde verilen difraktogramlarla uyumludur (249, 256-258).



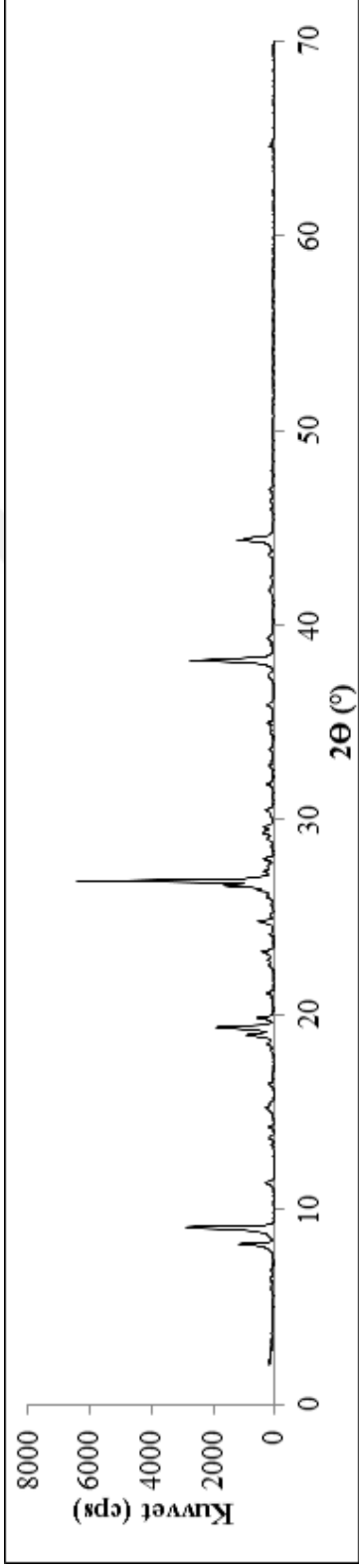
Şekil 4.18. Siprofloksasinin XRD difraktogramı ve A) siprofloksasine ait literatürdeki XRD difraktogramı (258).



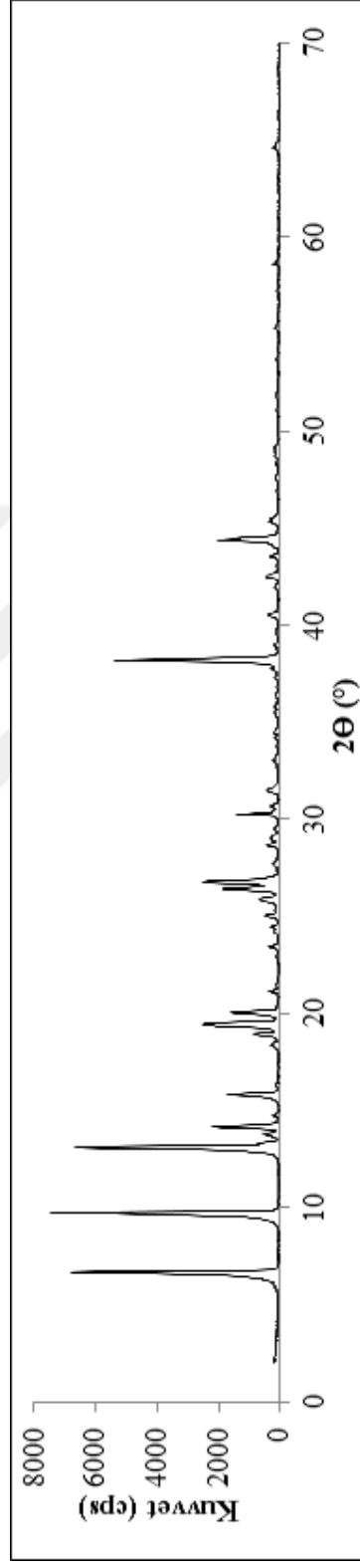
Şekil 4.19. Levofloksasinin XRD difraktogramı ve A) levofloksasine ait US 20060276463 A1 patentinde verilen XRD difraktogramı (259).



Şekil 4.20. Asetilsisteinin XRD difraktogramı ve A) asetilsisteine ait literatürdeki XRD difraktogramı (260).



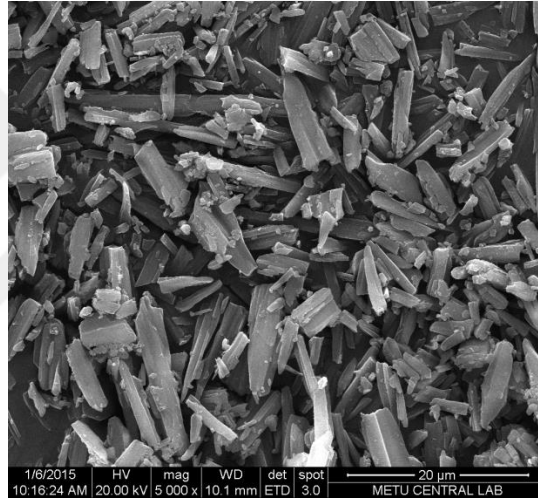
Şekil 4.21. Siprofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımının XRD difraktogramı.



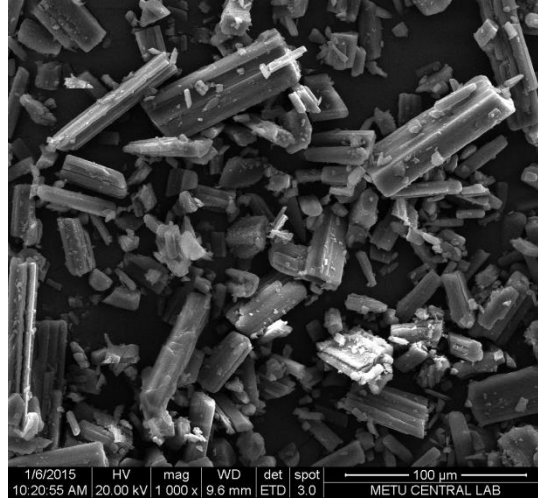
Şekil 4.22. Levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımının XRD difraktogramı.

4.1.6. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi (SEM)

Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein maddelerine ait SEM görüntüleri Mastersizer ile elde edilen partikül büyüklükleri (siprofloksasin için $d_{10}=3,136\pm0,162$ μm ; $d_{50}=14,607\pm0,261$ μm ; $d_{90}=43,232\pm1,068$ μm ; levofloksasin için $d_{10}=9,692\pm0,351$ μm ; $d_{50}=31,589\pm0,692$ μm ; $d_{90}=91,478\pm2,932$ μm ; asetilsistein için $d_{10}=236,550\pm6,452$ μm ; $d_{50}=386,370\pm8,371$ μm ; $d_{90}=616,100\pm13,822$ μm) ile uyumludur (Şekil 4.23.-Şekil 4.25.). İşlem görmemiş etkin maddelerin partikül büyüklüğünün inhale edilebilir boyutun çok üzerinde olduğu görülmüştür.



Şekil 4.23. Siprofloksasinin SEM görüntüsü (x5000).



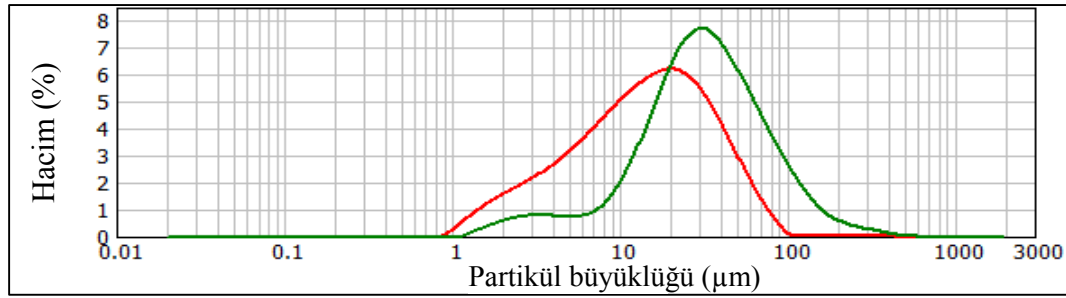
Şekil 4.24. Levofloksasinin SEM görüntüsü (x1000).



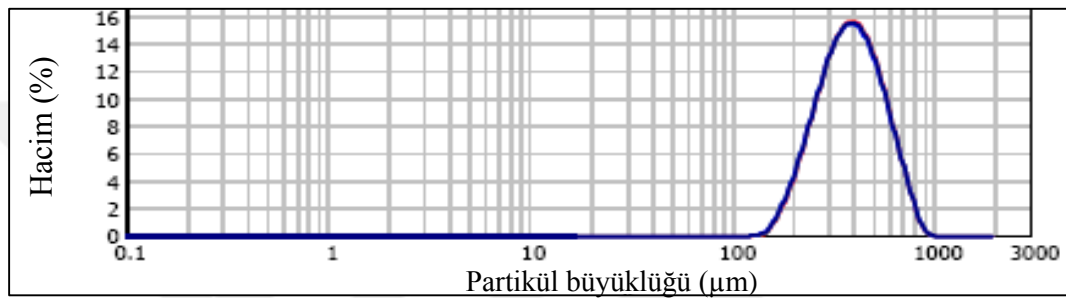
Şekil 4.25. Asetilsisteinin SEM görüntüsü (x100).

4.1.7. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsisteinin Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

İşlem görmemiş siprofloksasin ve levofloksasinin partikül büyüklüğü dağılımı tayini için Malvern Mastersizer Hydro 2000S aleti kullanılmıştır. Ardışık 6 ölçüm yapılmıştır. İşlem görmemiş asetilsisteinin partikül büyüklüğü dağılımı Malvern Mastersizer 2000 kuru toz ölçüm aygıtı ile tespit edilmiştir. İşlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin partikül büyüklüğü dağılımı bilgileri Tablo 4.2. ve Şekil 4.26.-Şekil 4.28.'de verilmiştir.



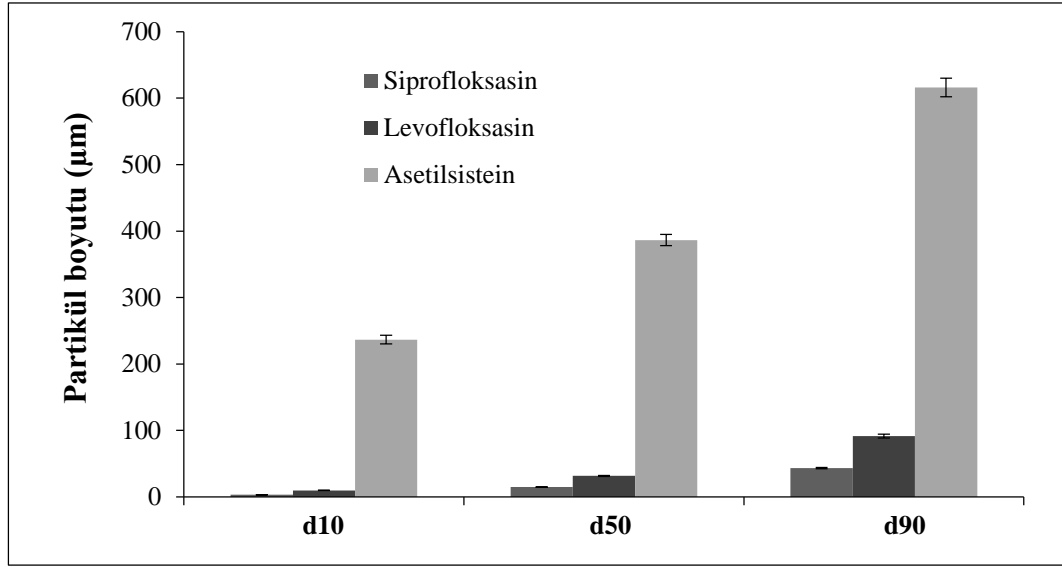
Şekil 4.26. Malvern Mastersizer 2000'den elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı (kırmızı çizgi-işlem görmemiş siprofloksasin; yeşil çizgi-işlem görmemiş levofloksasin).



Şekil 4.27. İşlem görmemiş asetilsisteinin Malvern Mastersizer 2000 (kuru toz)'den elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı.

Tablo 4.2. İşlem görmemiş etkin maddelerin partikül büyüklüğü dağılımı (ortalama \pm SS, n=6).

	d₁₀ (µm)	d₅₀ (µm)	d₉₀ (µm)	Span
Siprofloksasin	3,136 \pm 0,162	14,607 \pm 0,261	43,232 \pm 1,068	2,774 \pm 0,132
Levofloksasin	9,692 \pm 0,351	31,589 \pm 0,692	91,478 \pm 2,932	2,589 \pm 0,060
Asetilsistein	236,550 \pm 6,452	386,370 \pm 8,371	616,100 \pm 13,822	0,982 \pm 0,02



Şekil 4.28. İşlem görmemiş etkin maddelerin partikül büyüklüğü dağılımı (ortalama±SS, n=6).

4.2. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsistein Maddelerinin Miktar Tayini

4.2.1. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

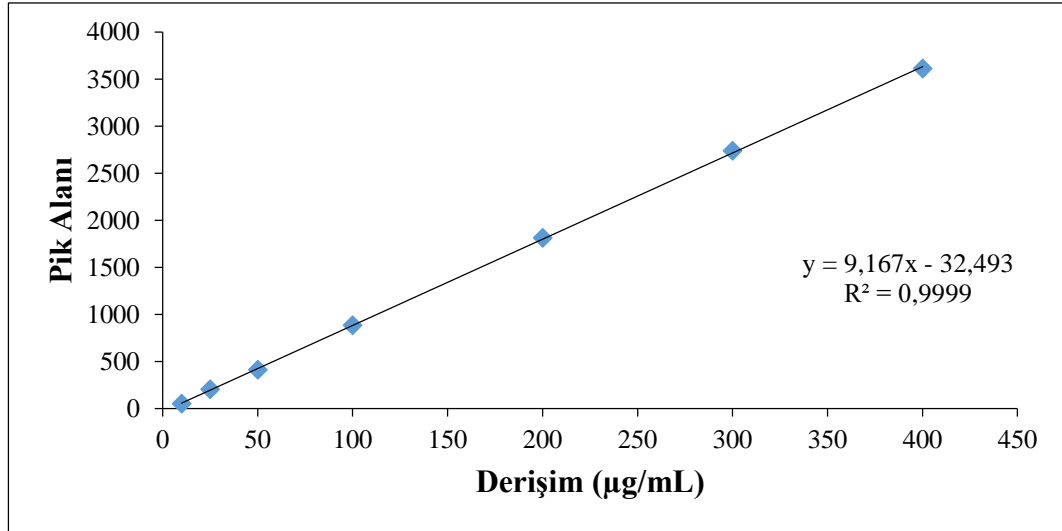
Etkin maddelere ait miktar tayini yöntemi; doğrusallık, doğruluk, kesinlik, özgünlük, duyarlılık, dayanıklılık açısından incelenmiş ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Doğrusallık (*Linearity*)

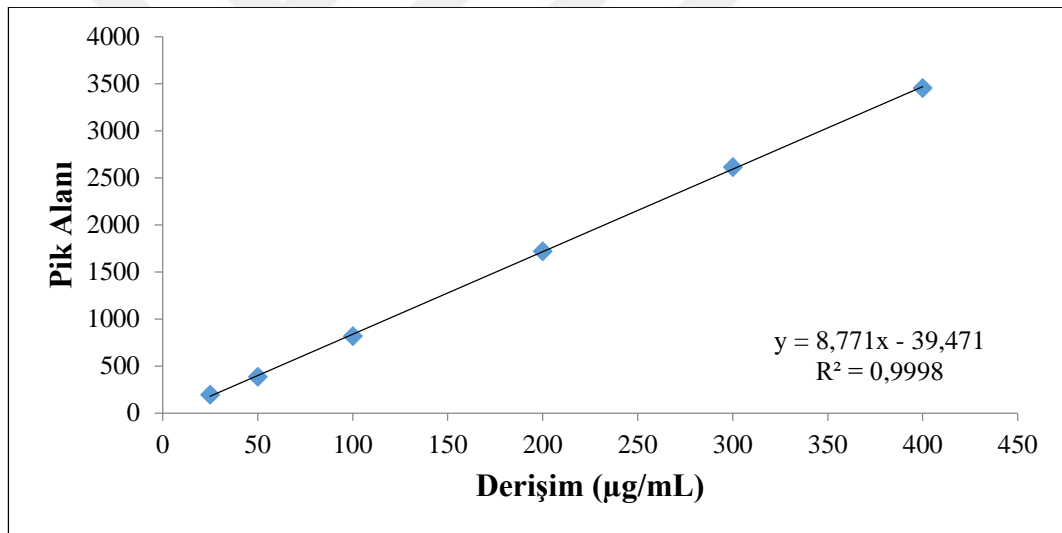
Hazırlanan stok çözeltilerden (1000 µg/mL) hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda farklı derişimlerdeki örneklerin HPLC analizi yapılmıştır. Hazırlanan derişimlere karşılık gelen pik alanlarından doğru denklemi elde edilmiştir. Tanımlayıcılık katsayısı siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein için $R^2=0,9999$ olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir.

Kalibrasyon Doğrusu

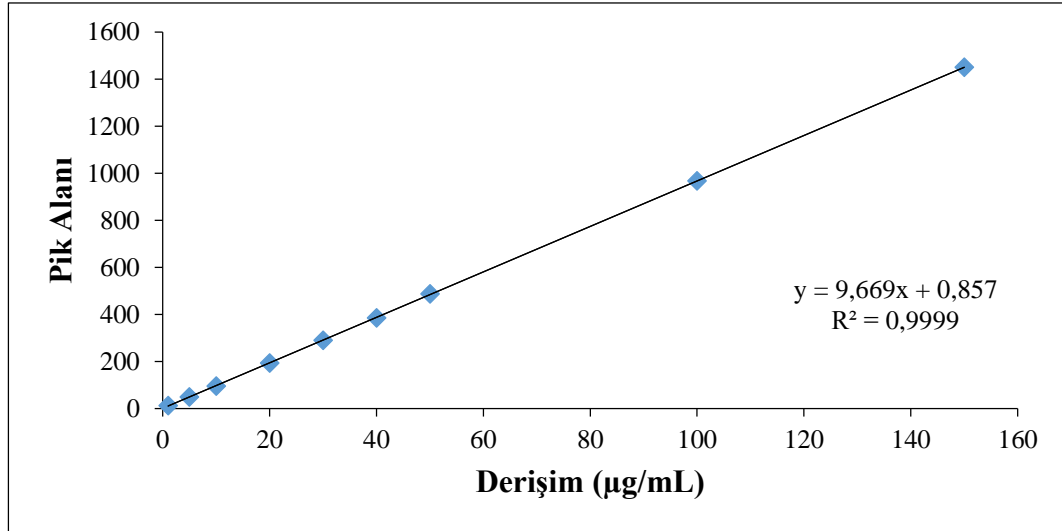
Siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein için kalibrasyon doğruları çizilmiş ve doğruların denklemi doğrusal regresyonla bulunmuştur. Kalibrasyon doğruları Şekil 4.29.-Şekil 4.37.'de verilmiştir.



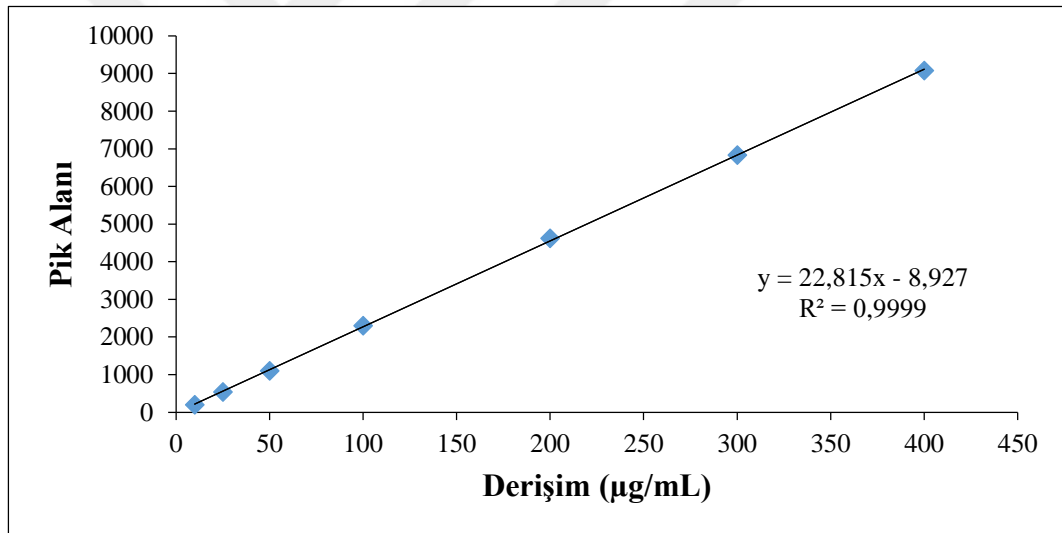
Şekil 4.29. Siprofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6).



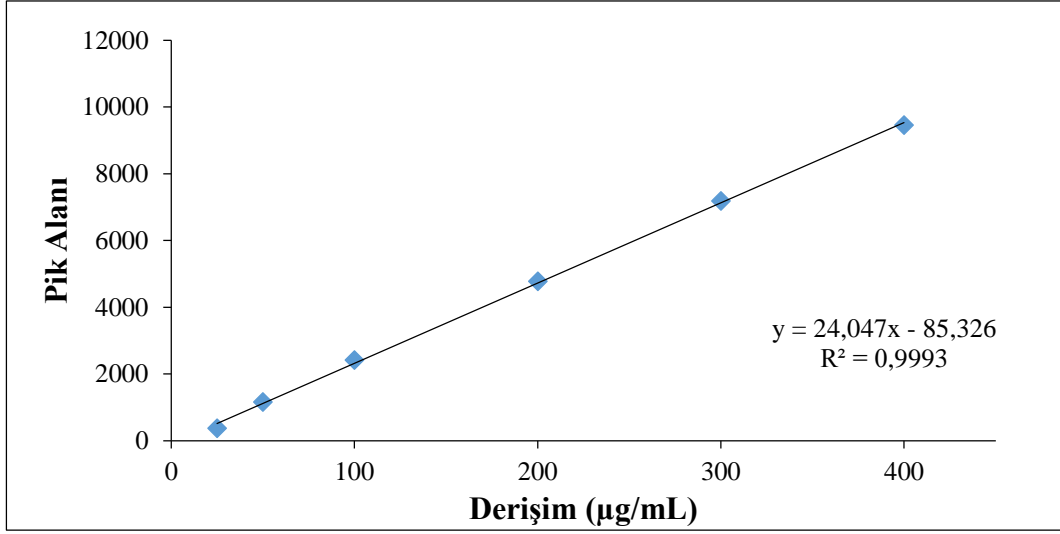
Şekil 4.30. Siprofloksasinin HBSS'de (permeabilite ortamı) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6).



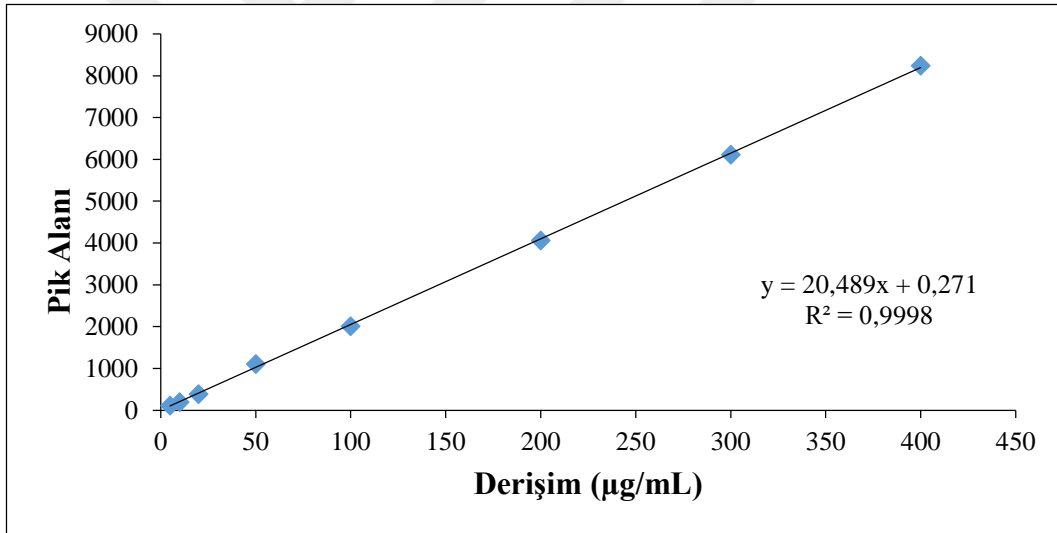
Şekil 4.31. Siprofloksasinin pH 6,4 ftalat tamponunda (çözünürlük ve çözünme ortamları) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6).



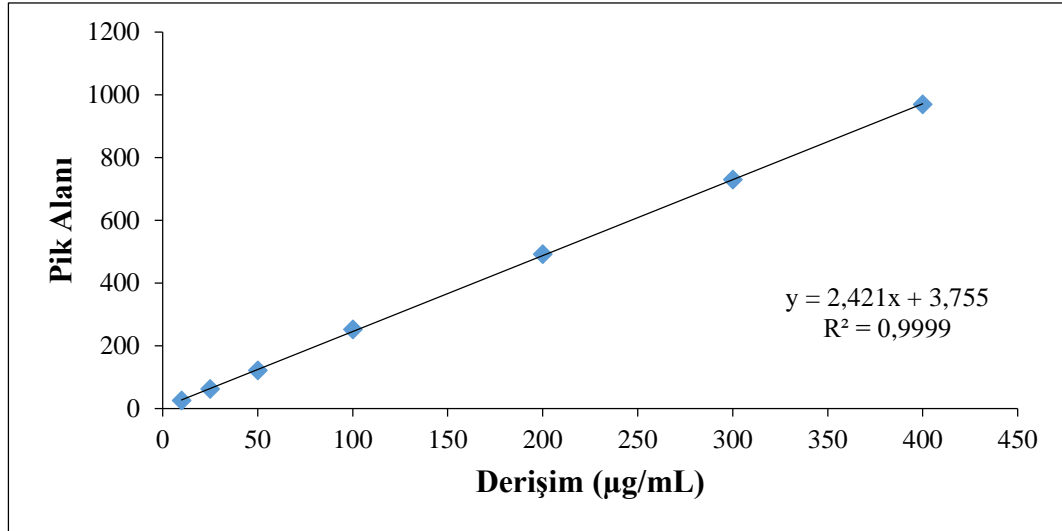
Şekil 4.32. Levofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6).



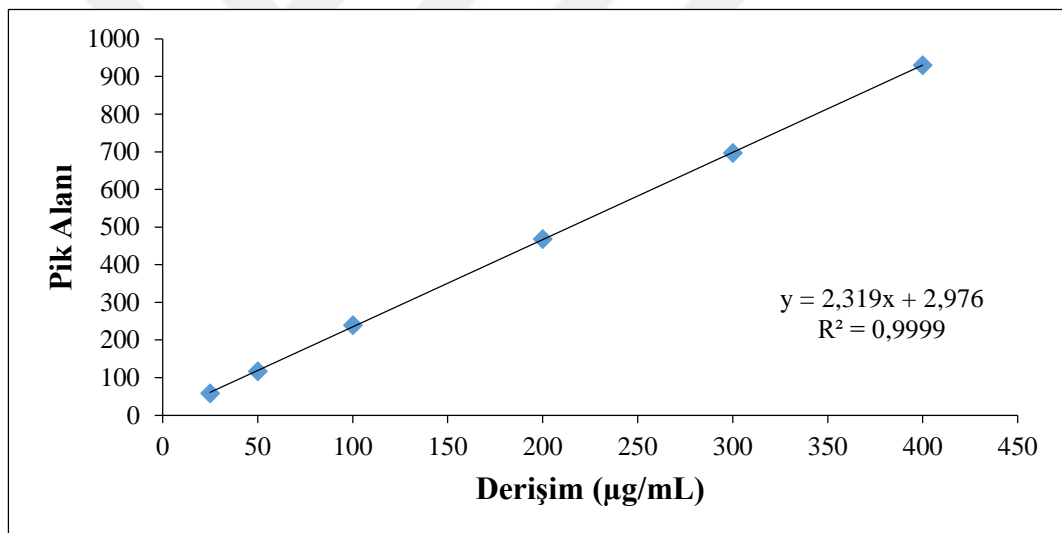
Şekil 4.33. Levofloksasinin HBSS'de (permeabilite ortamı) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6).



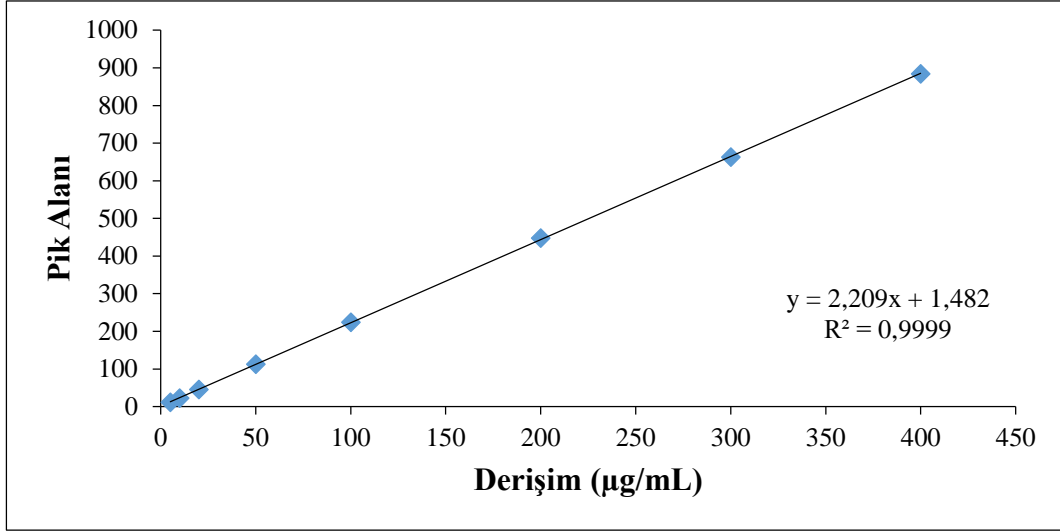
Şekil 4.34. Levofloksasinin pH 6,4 fosfat tamponunda (çözünme ortamı) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6).



Şekil 4.35. Asetilsisteinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6).

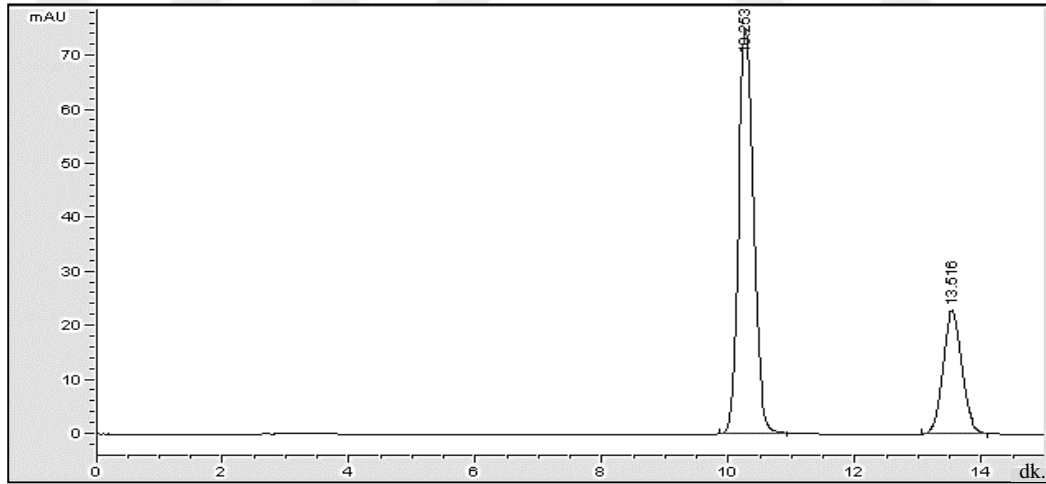


Şekil 4.36. Asetilsisteinin HBSS'de (permeabilite ortamı) kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6).

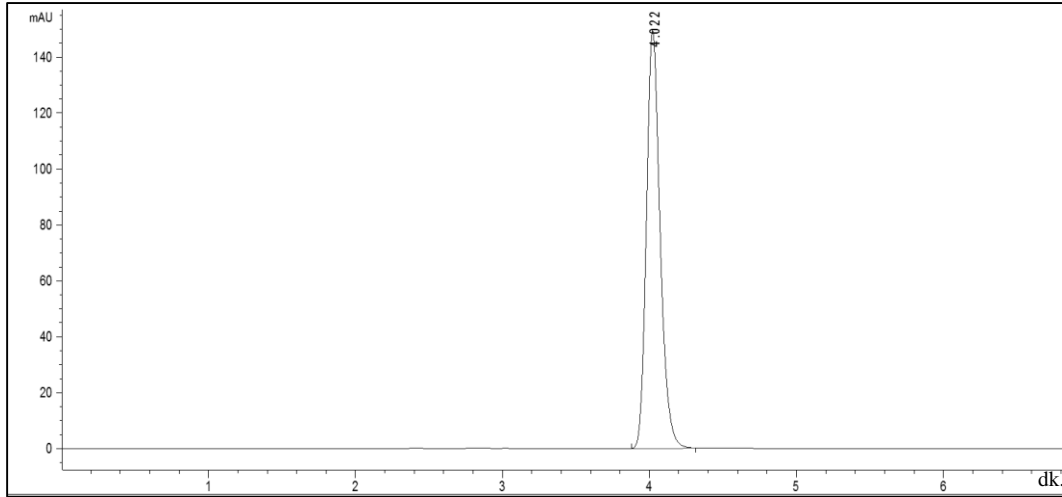


Şekil 4.37. Asetilsisteinin pH 6,4 fosfat tamponunda kalibrasyon doğrusu ve denklemi (ortalama±SH, n=6).

Maddelerin HPLC kromatogramlarında da görüldüğü gibi levofloksasinin alıkonma zamanı (t_R) 10,253, siprofloksasinin alıkonma zamanı (t_R) 13,516 (Şekil 4.38.), asetilsisteinin alıkonma zamanı (t_R) 4,022 dakikadır (Şekil 4.39.).



Şekil 4.38. Metanol:25 mM KH_2PO_4 (pH:3,0) (28:72) mobil faz sistemindeki siprofloksasin ve levofloksasine (100 µg/mL) ait HPLC kromatogramı ($\lambda=293$ nm).



Şekil 4.39. Metanol:25 mM KH_2PO_4 (pH:3.0) (28:72) mobil faz sistemindeki asetilsisteine (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ait HPLC kromatogramı ($\lambda=214$ nm).

Doğruluk (Accuracy)

Düşük, orta, yüksek olmak üzere üç farklı derişim seçilmiş ve örneklerin analizi sonucunda bulunan değerler kalibrasyon doğrusunda yerine konularak derişim ve yüzde geri kazanım miktarları hesaplanmıştır (Tablo 4.3.-Tablo 4.5.). Her üç derişimde de varyasyon katsayısı değeri %2'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.3. Siprofloksasinin metanol:25 mM KH_2PO_4 pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimleri için doğruluk sonuçları (n=6).

Eklenen Derişim ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Tayin Edilen Derişim ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			% Geri Kazanılan		
400	100	10	403,672	99,736	9,835	100,918	99,736	98,350
400	100	10	407,567	98,067	9,933	101,892	98,067	99,332
400	100	10	404,021	99,987	10,070	101,005	99,987	100,695
400	100	10	407,556	98,230	9,884	101,889	98,230	98,841
400	100	10	393,701	100,019	9,933	98,425	100,019	99,332
400	100	10	401,196	99,529	9,955	100,299	99,529	99,550
Ortalama			402,952	99,261	9,935	100,743	99,261	99,350
SS			5,154	0,882	0,079	1,288	0,882	0,789
VK (%)			1,279	0,888	0,794	1,279	0,888	0,794

Tablo 4.4. Levofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10 µg/mL, 100 µg/mL ve 400 µg/mL derişimleri için doğruluk sonuçları (n=6).

Eklenen Derişim (µg/mL)			Tayin Edilen Derişim (µg/mL)			% Geri Kazanılan		
400	100	10	394,345	99,748	9,968	98,586	99,748	99,683
400	100	10	392,276	101,518	10,038	98,069	101,518	100,385
400	100	10	396,611	100,515	9,968	99,153	100,515	99,683
400	100	10	396,580	98,555	10,166	99,145	98,555	101,656
400	100	10	402,909	98,389	10,135	100,727	98,389	101,349
400	100	10	395,949	99,160	9,929	98,987	99,160	99,289
Ortalama			396,445	99,647	10,034	99,111	99,647	100,341
SS			3,574	1,206	0,097	0,894	1,206	0,971
VK (%)			0,902	1,210	0,968	0,902	1,210	0,968

Tablo 4.5. Asetilsisteinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10 µg/mL, 100 µg/mL ve 400 µg/mL derişimleri için doğruluk sonuçları (n=6).

Eklenen Derişim (µg/mL)			Tayin Edilen Derişim (µg/mL)			% Geri Kazanılan		
400	100	10	397,383	98,730	9,842	99,346	98,730	98,418
400	100	10	395,401	98,482	10,007	98,850	98,482	100,070
400	100	10	397,590	99,597	9,966	99,397	99,597	99,657
400	100	10	395,855	99,184	10,172	98,964	99,184	101,722
400	100	10	396,888	100,671	9,924	99,222	100,671	99,244
400	100	10	395,731	99,184	9,883	98,933	99,184	98,831
Ortalama			396,475	99,308	9,966	99,119	99,308	99,657
SS			0,931	0,773	0,117	0,233	0,773	1,168
VK (%)			0,235	0,779	1,172	0,235	0,779	1,172

Kesinlik

- Tekrar Edilebilirlik (*Repeatability*)

10 µg/mL ve 400 µg/mL (asetilsistein için 10 µg/mL ve 300 µg/mL) olacak şekilde düşük ve yüksek iki farklı etkin madde derişimi

seçilmiştir. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için ortalama, SS ve VK hesaplanmıştır. VK'nin %2'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir (Tablo 4.6.-Tablo 4.8.).

Tablo 4.6. Siprofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10µg /mL ve 400 µg/mL derişimleri için tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6).

Örnek	Derişim (µg/mL)	Ortalama±SS	VK (%)
10 µg/mL	10,069	10,041±0,056	0,561
	10,058		
	10,069		
	10,069		
	9,927		
	10,058		
400 µg/mL	406,218	404,747±0,864	0,213
	404,352		
	404,832		
	403,610		
	404,974		
	404,494		

Tablo 4.7. Levofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10µg /mL ve 400 µg/mL derişimleri için tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6).

Örnek	Derişim (µg/mL)	Ortalama±SS	VK (%)
10 µg/mL	9,946	9,930±0,054	0,540
	9,968		
	9,964		
	9,942		
	9,824		
	9,938		
400 µg/mL	397,919	396,936±0,634	0,160
	396,447		
	396,964		
	396,091		
	396,959		
	397,235		

Tablo 4.8. Asetilsisteinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) (1:2000 oranında sodyum metabisülfite içeren) mobil faz sistemindeki 10µg/mL ve 300 µg/mL derişimleri için tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6).

Örnek	Derişim (µg/mL)	Ortalama±SS	VK (%)
10 µg/mL	10,179	9,972±0,161	1,615
	10,137		
	9,848		
	9,807		
	9,848		
	10,014		
300 µg/mL	298,259	300,407±1,658	0,552
	300,985		
	301,935		
	302,183		
	298,589		
	300,489		

- **Tekrar Elde Edilebilirlik (*Reproducibility*)**

10 µg/mL ve 400 µg/mL (asetilsistein için 10 ve 300 µg/mL) içeren 6 ayrı çözelti hazırlanmış ve çözeltilerin pik alanları HPLC ile 293 ve 214 nm dalga boyunda saptanmıştır. Daha sonra, bu pik alanlarına karşılık gelen derişimler için ortalama, SS ve VK hesaplanmıştır. VK'nin %2'den küçük olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini gösterir (Tablo 4.9.-Tablo 4.11.).

Tablo 4.9. Siprofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10µg/mL ve 400 µg/mL derişimleri için tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6).

Örnek	Derişim (µg/mL)	Ortalama±SS	VK (%)
10 µg/mL	10,058	10,058±0,142	1,413
	10,156		
	9,992		
	9,807		
	10,156		
	10,178		
400 µg/mL	402,399	401,679±5,154	1,283
	406,294		
	402,748		
	406,283		
	392,428		
	399,923		

Tablo 4.10. Levofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki 10µg/mL ve 400 µg/mL derişimleri için tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6).

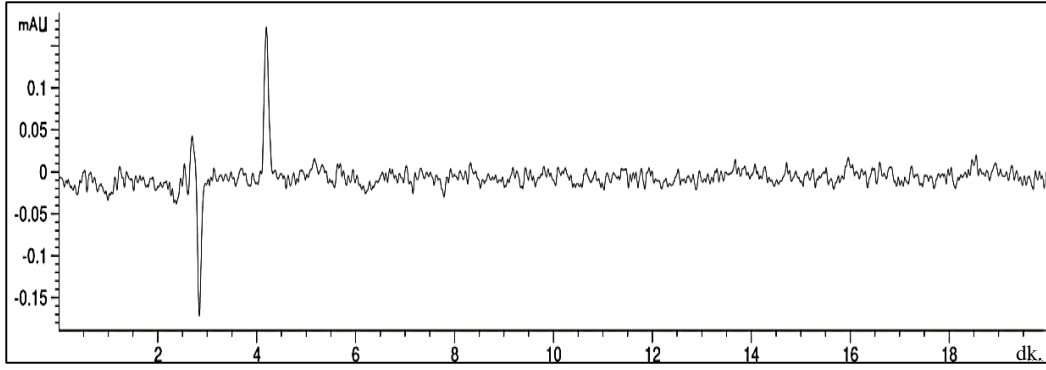
Örnek	Derişim (µg/mL)	Ortalama±SS	VK (%)
10 µg/mL	9,968	10,034±0,097	0,968
	10,038		
	9,968		
	10,166		
	10,135		
	9,929		
400 µg/mL	395,728	397,828±1,348	0,339
	398,042		
	397,994		
	397,963		
	399,909		
	397,332		

Tablo 4.11. Asetilsisteinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) (1:2000 oranında sodyum metabisülfid içeren) mobil faz sistemindeki 10 µg /mL ve 300 µg/mL derişimleri için tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6).

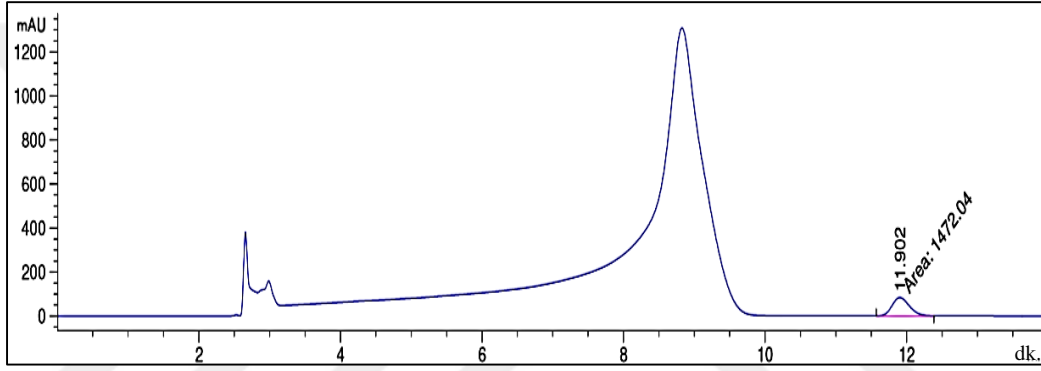
Örnek	Derişim (µg/mL)	Ortalama±SS	VK (%)
10 µg/mL	10,034	10,065±0,134	1,334
	10,034		
	10,199		
	10,158		
	10,137		
	9,828		
300 µg/mL	300,902	298,989±1,207	0,404
	298,879		
	299,911		
	298,424		
	297,681		
	298,135		

Özgüllük (*Specificity*)

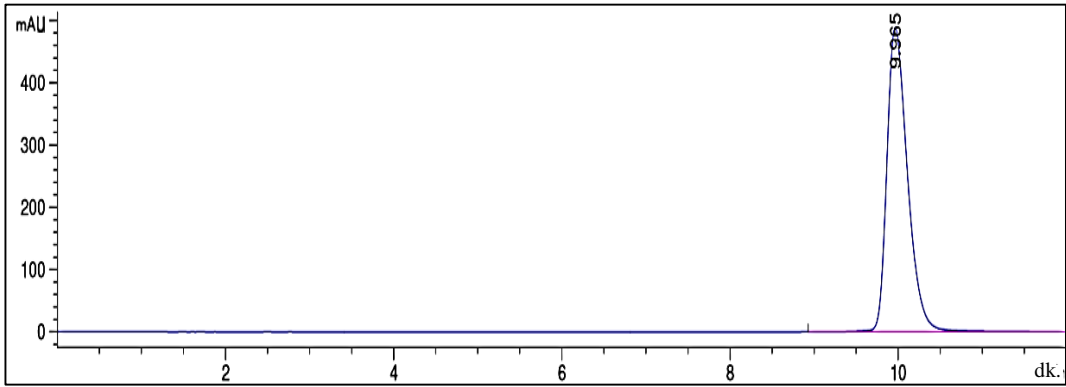
Yapılan çalışmalarda kullanılan maddelerin, farklı zaman noktalarında pik verdiği; çözünme, çözünürlük ve permeabilite ortamlarının etkin maddelerle aynı noktalarda pik vermediği gözlenmiştir. Bu da HPLC yöntemimizin çalışmalarımız için özgül olduğunu, diğer maddelerle girişim yapmadığını göstermektedir (Şekil 4.38.- Şekil 4.46.).



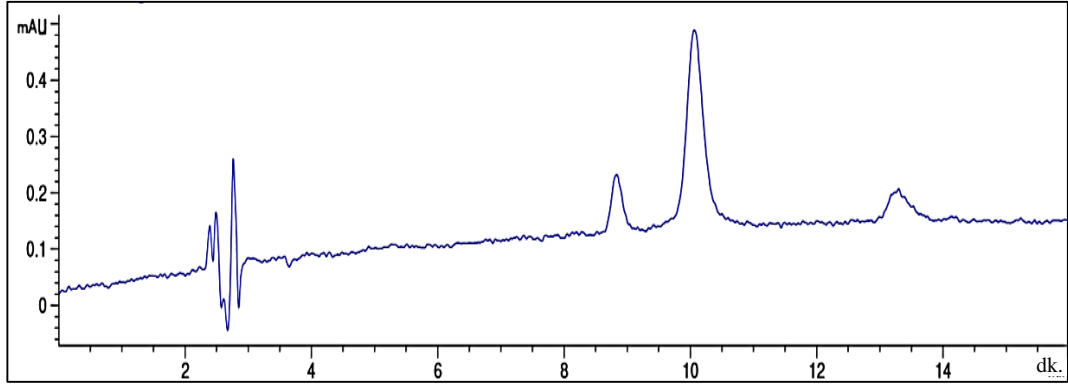
Şekil 4.40. Metanol:25 mM KH_2PO_4 (pH:3,0) (28:72) mobil faz sistemindeki dornaz alfa maddesine ($200 \mu\text{g/mL}$) ait HPLC kromatogramı ($\lambda=293 \text{ nm}$).



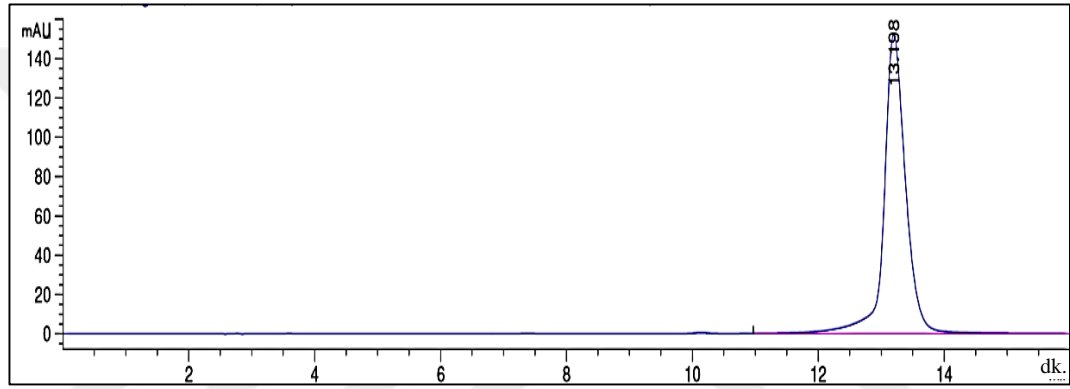
Şekil 4.41. pH 6,4 ftalat tamponu sistemindeki siprofloksasine ($150 \mu\text{g/mL}$) ait HPLC kromatogramı ($\lambda=293 \text{ nm}$).



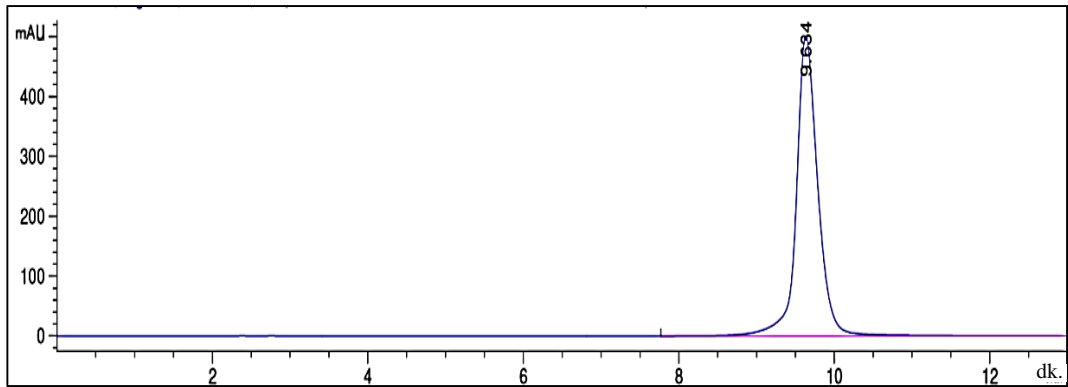
Şekil 4.42. pH 6,4 fosfat tamponu sistemindeki levofloksasin maddesine ($400 \mu\text{g/mL}$) ait HPLC kromatogramı ($\lambda=293 \text{ nm}$).



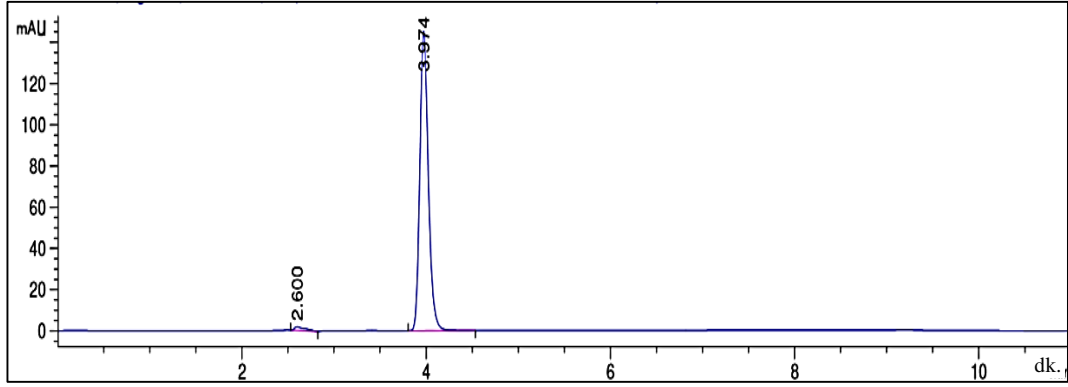
Şekil 4.43. 10 mM HEPES içeren HBSS transport ortamına ait HPLC kromatogramı ($\lambda=293$ nm).



Şekil 4.44. 10 mM HEPES içeren HBSS transport ortamında siprofloksasin maddesine (400 $\mu\text{g/mL}$) ait HPLC kromatogramı ($\lambda=293$ nm).



Şekil 4.45. 10 mM HEPES içeren HBSS transport ortamında levofloksasin maddesine (400 $\mu\text{g/mL}$) ait HPLC kromatogramı ($\lambda=293$ nm).



Şekil 4.46. 10 mM HEPES içeren HBSS transport ortamında asetilsistein maddesine (400 µg/mL) ait HPLC kromatogramı ($\lambda=214$ nm).

Duyarlılık (*Sensitivity*)

Yapılan analizler ve değerlendirmeler sonucunda siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin teşhis sınırı (*Limit of detection-LOD*), sırasıyla 0,098 µg/mL, 0,049 µg/mL, 0,487 µg/mL; tayin sınırı (*Limit of quantification-LOQ*) ise sırasıyla, 0,328 µg/mL, 0,165 µg/mL, 1,624 µg/mL olarak bulunmuştur.

Dayanıklılık

Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin belirli derişimlerde hazırlanan çözeltileri, analiz süresince dayanıklılıklarının gösterilebilmesi için değerlendirilmiştir. Deney süresi 24 saati geçmediği için, dayanıklılık 24 saat süreyle incelenmiştir. Bu süre boyunca, zamana karşı derişim farkları istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Mann-Whitney U testi, $p>0.05$). Bu sonuçlar, maddelerimizin HPLC’de analiz edildiği süre boyunca dayanıklı olduğunu göstermektedir (Tablo 4.12.-Tablo 4.14.).

Tablo 4.12. Siprofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki dayanıklılığı (n=6).

Zaman (saat)	Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL) ortalama ± SS
0	400	403,644 ± 0,763
4	400	401,988 ± 1,577
12	400	402,133 ± 5,013
24	400	402,582 ± 5,045

Tablo 4.13. Levofloksasinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki dayanıklılığı (n=6).

Zaman (saat)	Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL) ortalama ± SS
0	400	396,816 ± 0,334
4	400	396,121 ± 1,344
12	400	395, 716 ± 2,998
24	400	394,932 ± 3,744

Tablo 4.14. Asetilsisteinin metanol:25 mM KH₂PO₄ pH:3 ((fosforik asit) 28:72) mobil faz sistemindeki dayanıklılığı (n=6).

Zaman (saat)	Derişim (µg/mL)	Hesaplanan Derişim (µg/mL) ortalama ± SS
0	300	298,365 ± 0,653
4	300	300,017±1,558
12	300	298,228±1,227
24	300	299,217±1,667

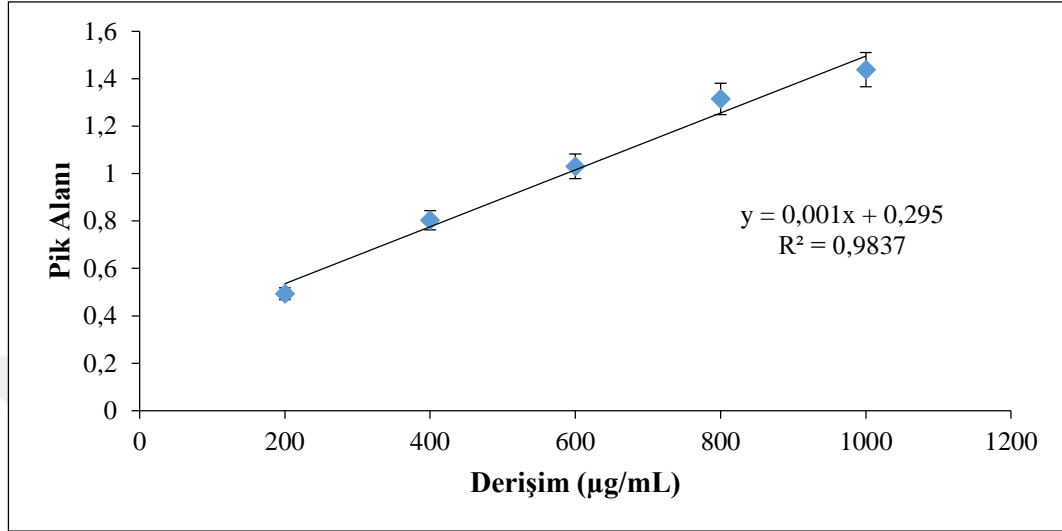
4.3. Dornaz Alfa Maddesinin Miktar Tayini

Doğrusallık (*Linearity*)

Hazırlanan stok çözeltilerden (1000 µg/mL) hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda farklı derişimlerdeki örneklerin BCA analizi yapılmıştır. Tanımlayıcılık katsayısı dornaz alfa için $R^2=0,9837$ olarak bulunmuş, kalibrasyon denkleminin doğrusallığı gösterilmiştir.

Kalibrasyon Doğrusu

Dornaz alfa için kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve doğru denklemi doğrusal regresyonla bulunmuştur. Kalibrasyon doğrusu Şekil 4.47.'de verilmiştir.



Şekil 4.47. Dornaz alfanın BCA yöntemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusu (ortalama±SH, n=6).

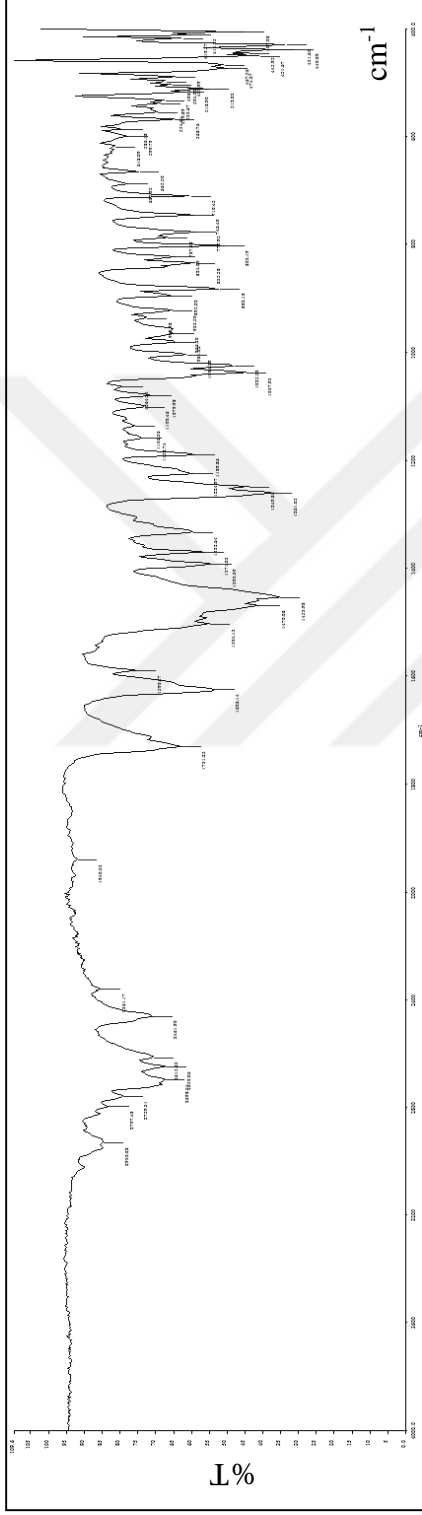
Özgüllük (Specificity)

Tez çalışması kapsamında, BCA yönteminin, dornaz alfa maddesi için özgül olduğunu göstermek amacıyla siprofloksasin ve levofloksasin analiz edildiğinde, bu maddelerin 562 nm'de absorbands vermediği gözlenmiştir.

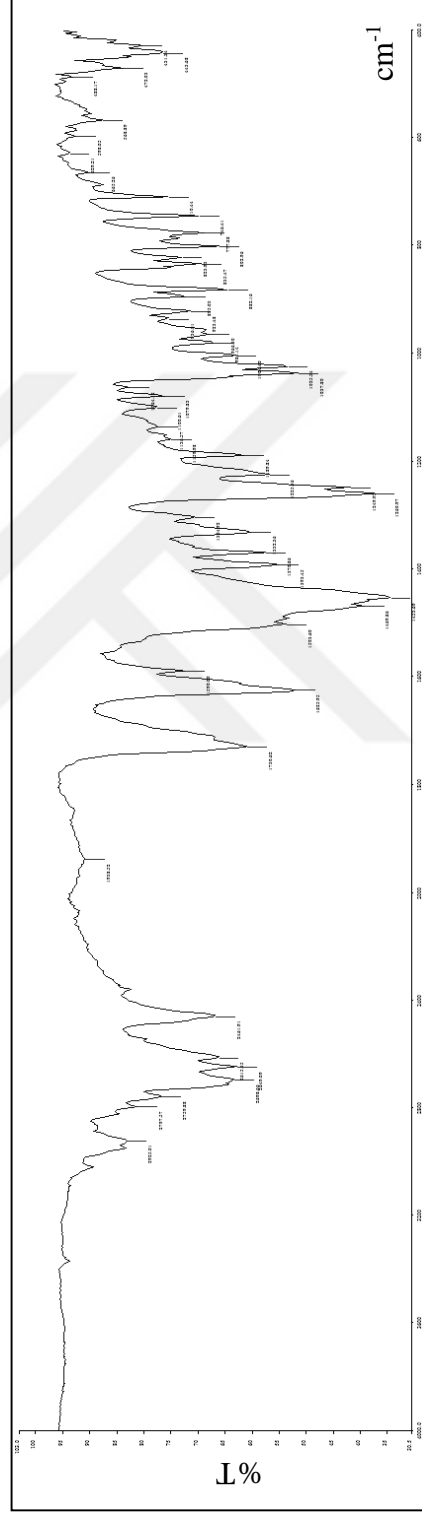
4.4. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

4.4.1. Formülasyonların FT-IR Spektrumları

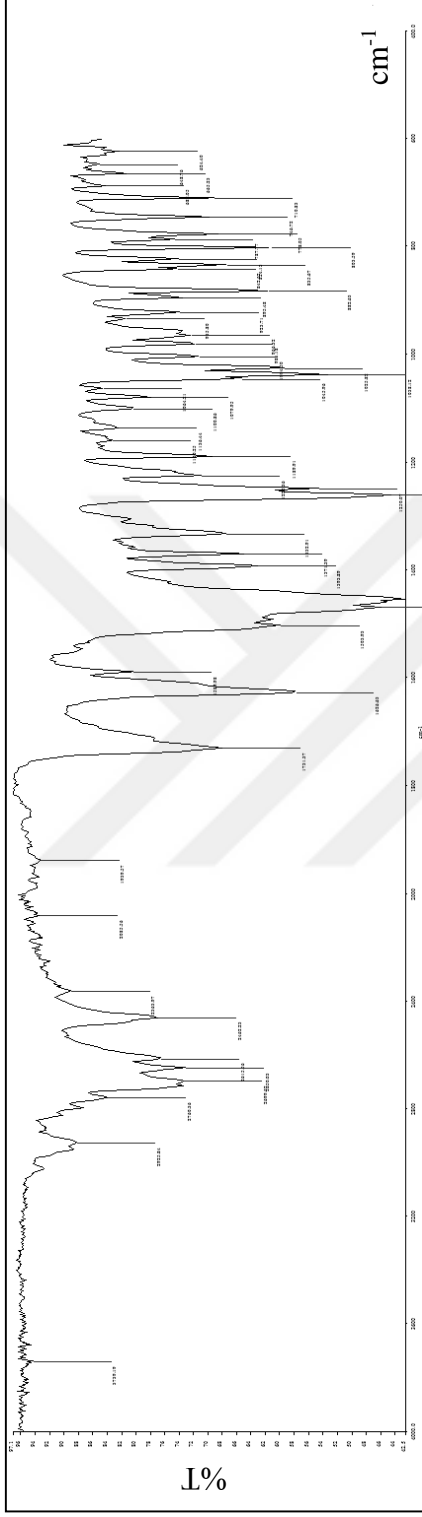
Perkin Elmer (USA) FT-IR spektrofotometresinde 4000-600 cm⁻¹ dalga sayıları arasında formülasyonlara ait kaydedilen FT-IR spektrumlarına ait bulgular Şekil 4.48.-Şekil 4.53.'te verilmiştir.



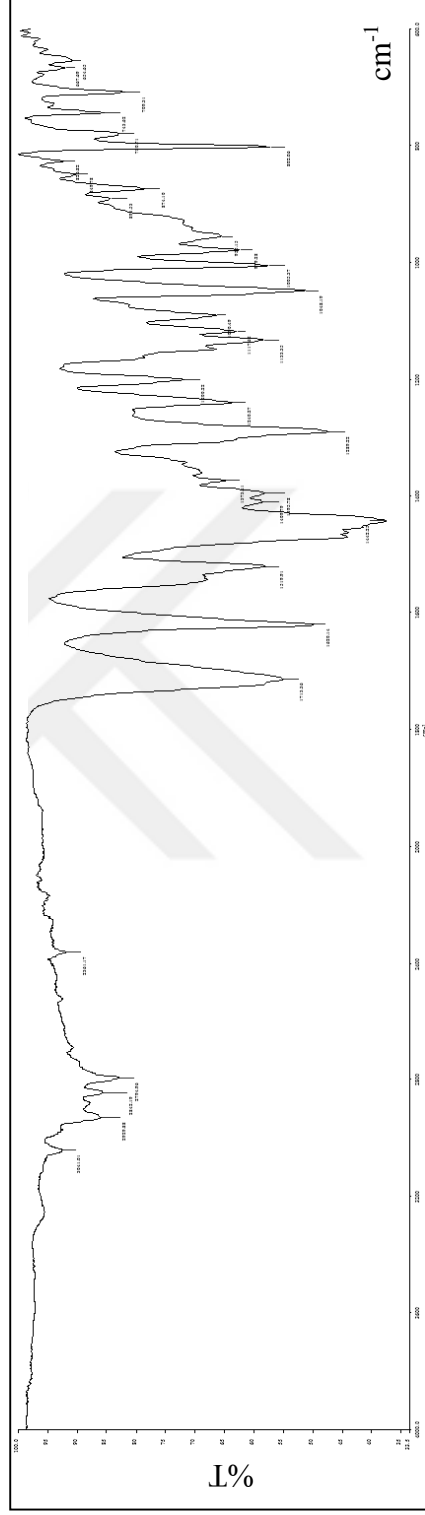
Şekil 4.48. Siprofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).



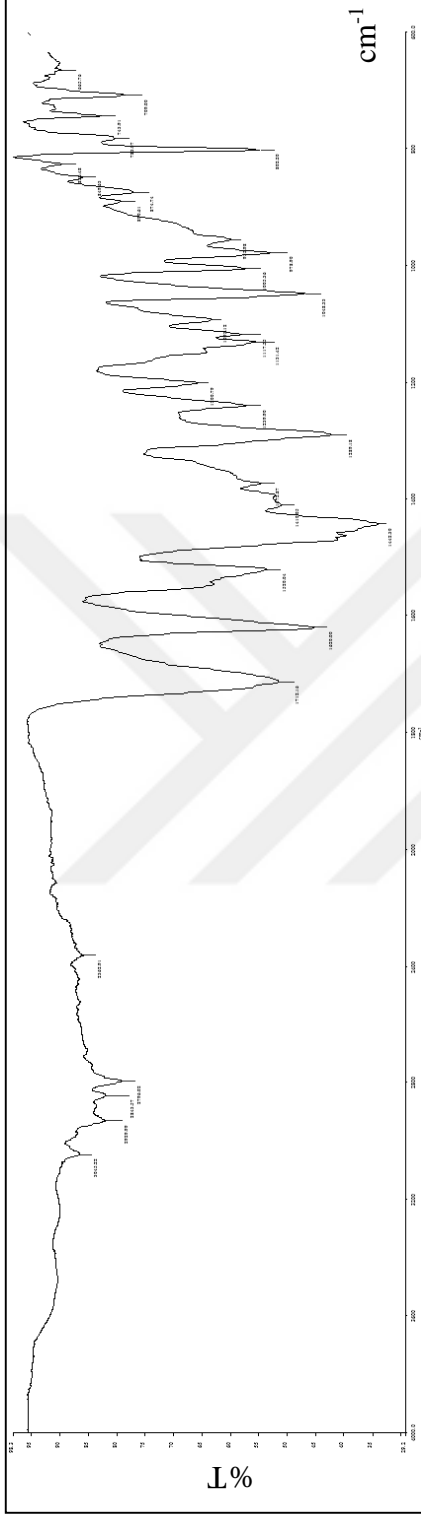
Şekil 4.49. Siprofloksasin ve asetilsistein içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).



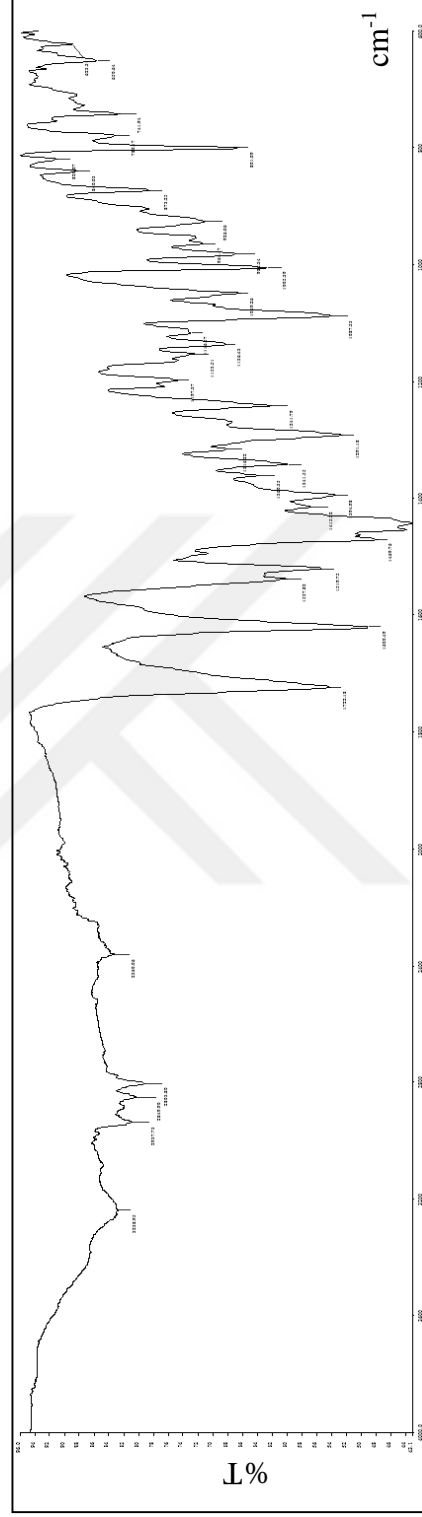
Şekil 4.50. Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).



Şekil 4.51. Levofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).



Şekil 4.52. Levofloksasin ve asetilsistein içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).

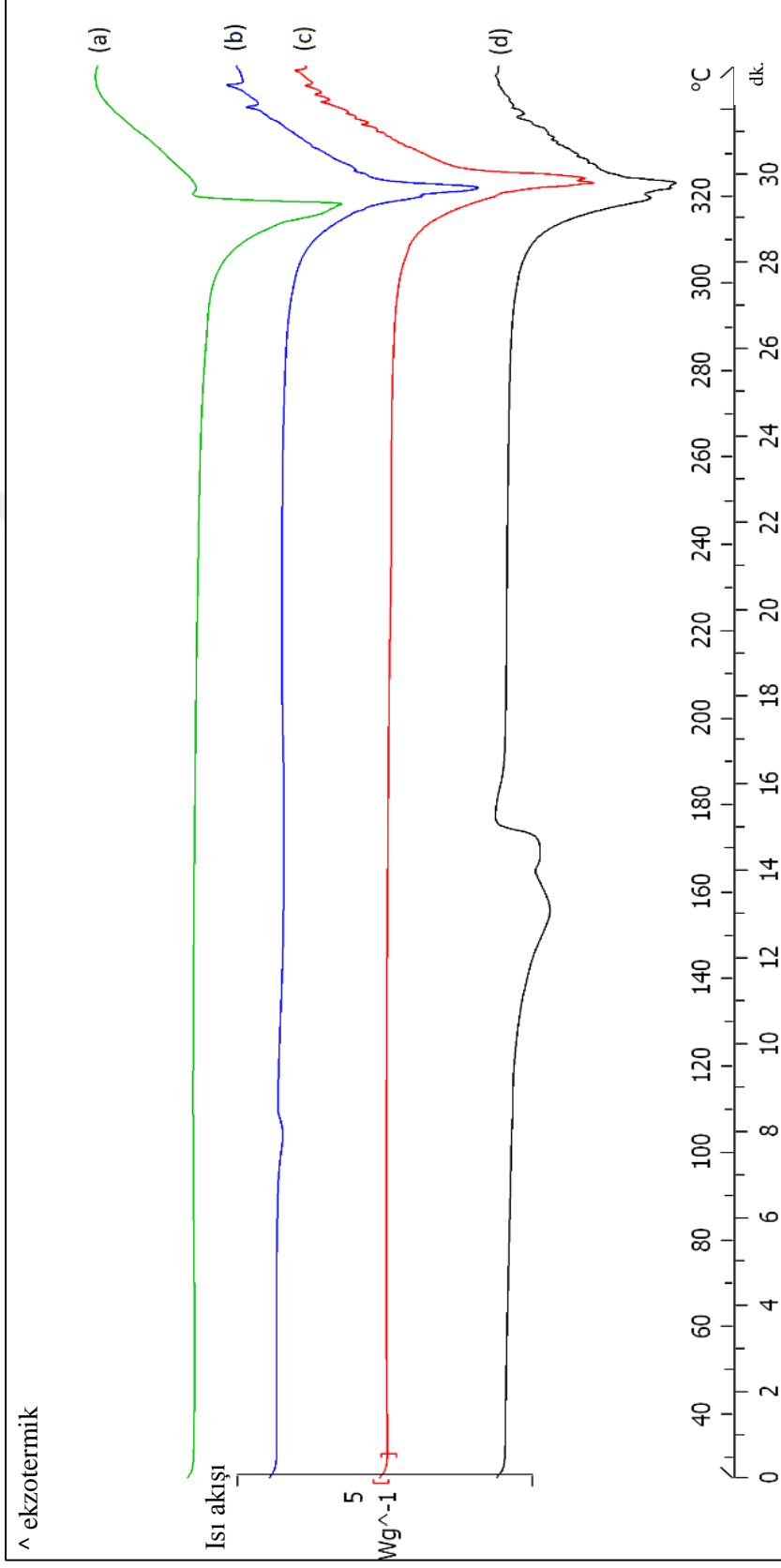


Şekil 4.53. Levofloksasin ve dornaz alfa içeren kuru toz inhaler formülasyonunun FT-IR spektrumu (Dalga sayısının (cm^{-1}) fonksiyonu olarak % iletim).

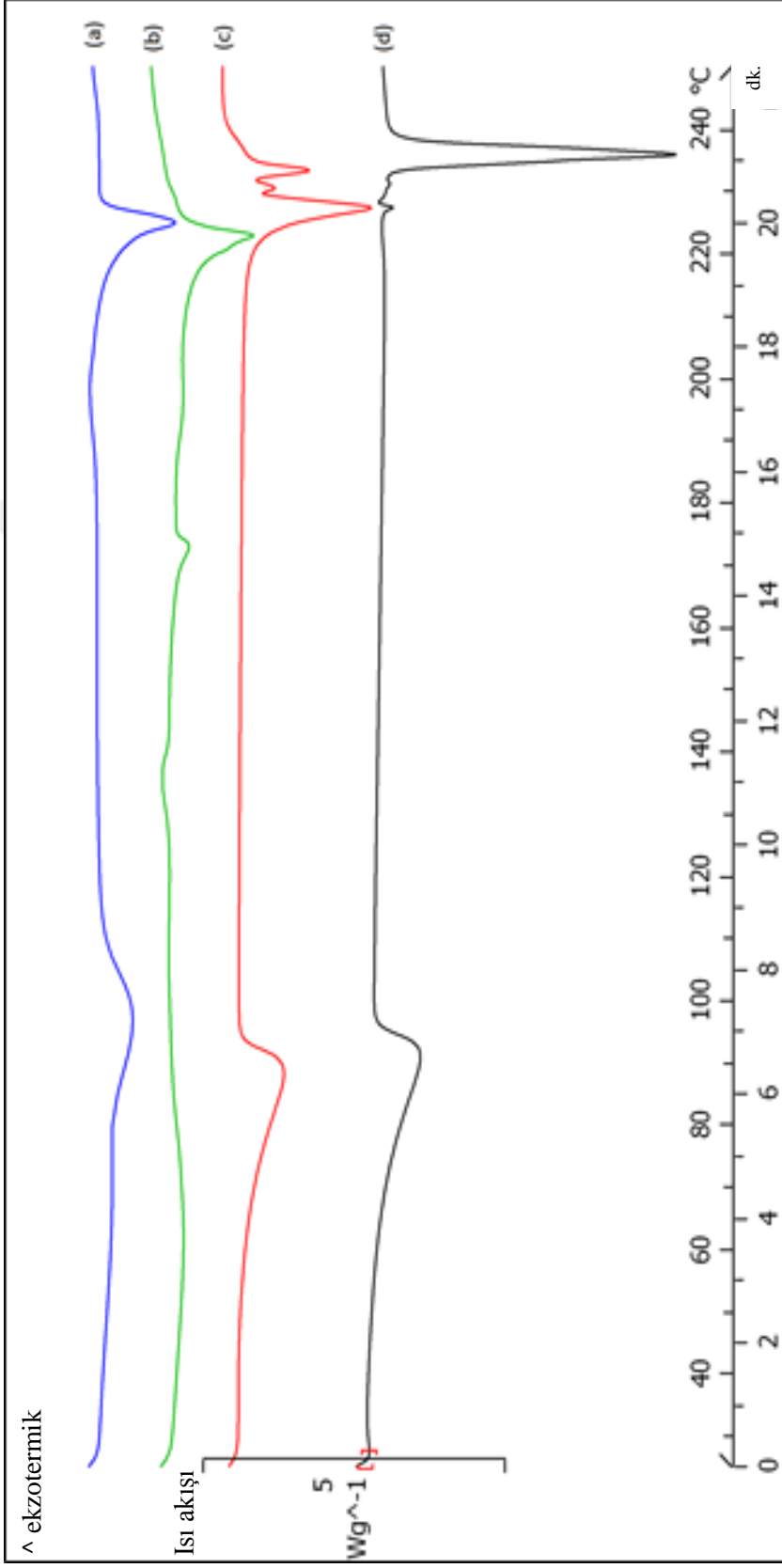
4.4.2. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Analizi (DSC)

Formülasyonlar için DSC analizinden elde edilen termogramlar Şekil 4.54.- Şekil 4.55.'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar formülasyona giren maddelerin erime derecelerinin değişmediğini göstermektedir. Siprofloksasin ve levofloksasin maddelerine ait erime dereceleri sırasıyla 319,26-321,49°C ve 223,77-233,32°C aralıkları içerisinde bulunmuştur.





Şekil 4.54. Siprofloksasin ve dornaz alfa (a), siprofloksasin ve asetilsistein (b), sadece siprofloksasin (c) içeren formülasyonlar ve işlem görmemiş siprofloksasine (d) ait DSC termogramları.



Şekil 4.55. Levofloksasin ve dornaz alfa (a), levofloksasin ve asetilsistein (b), sadece levofloksasin (c) içeren formülasyonlar ve işlem görmemiş levofloksasine (d) ait DSC termogramları.

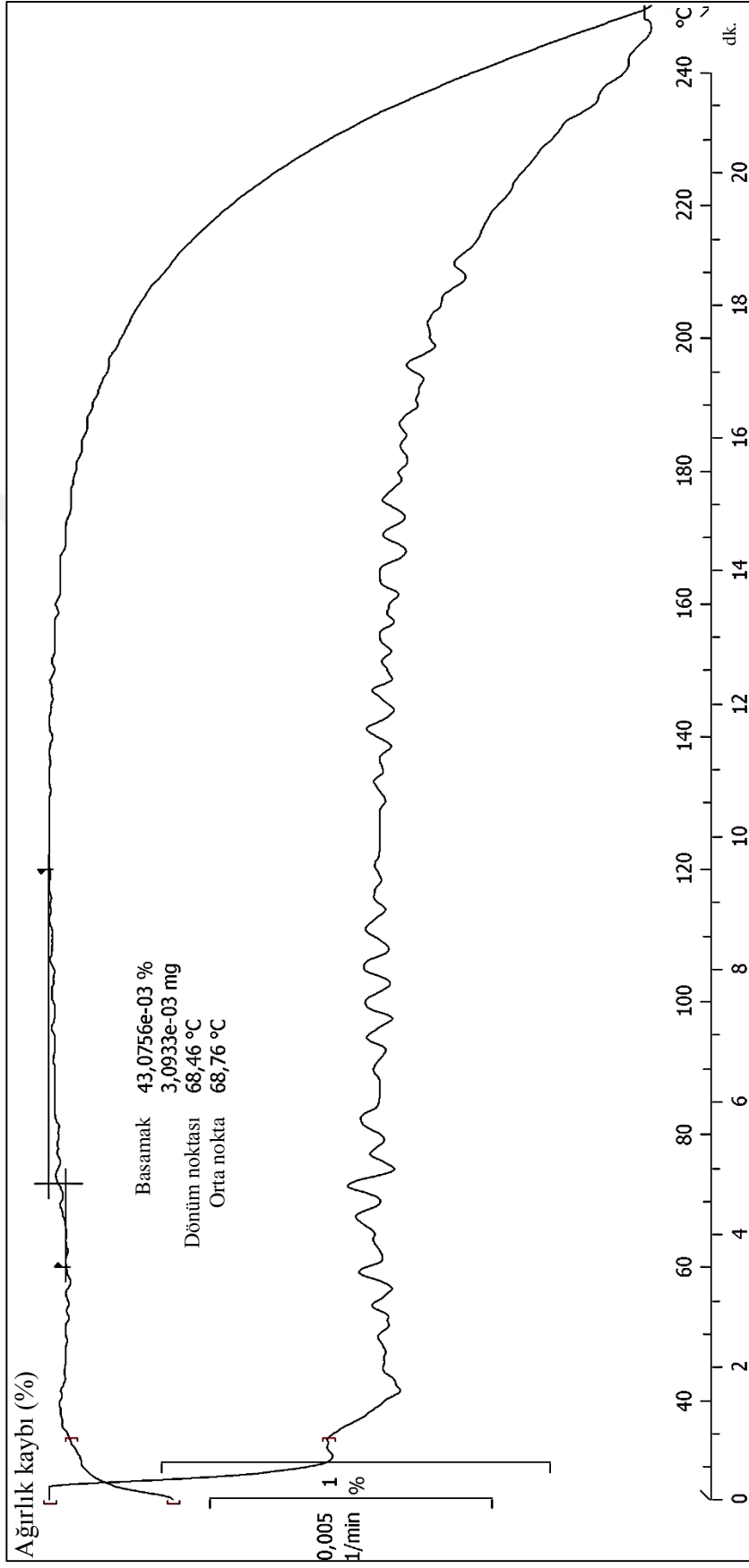
4.4.3. Formülasyonların Termogravimetrik Analizi (TGA)

Geliştirilen KTİ'lere ait, TGA analizi sonuçları Tablo 4.15.'te ve Şekil 4.56.-Şekil 4.61.'de verilmiştir.

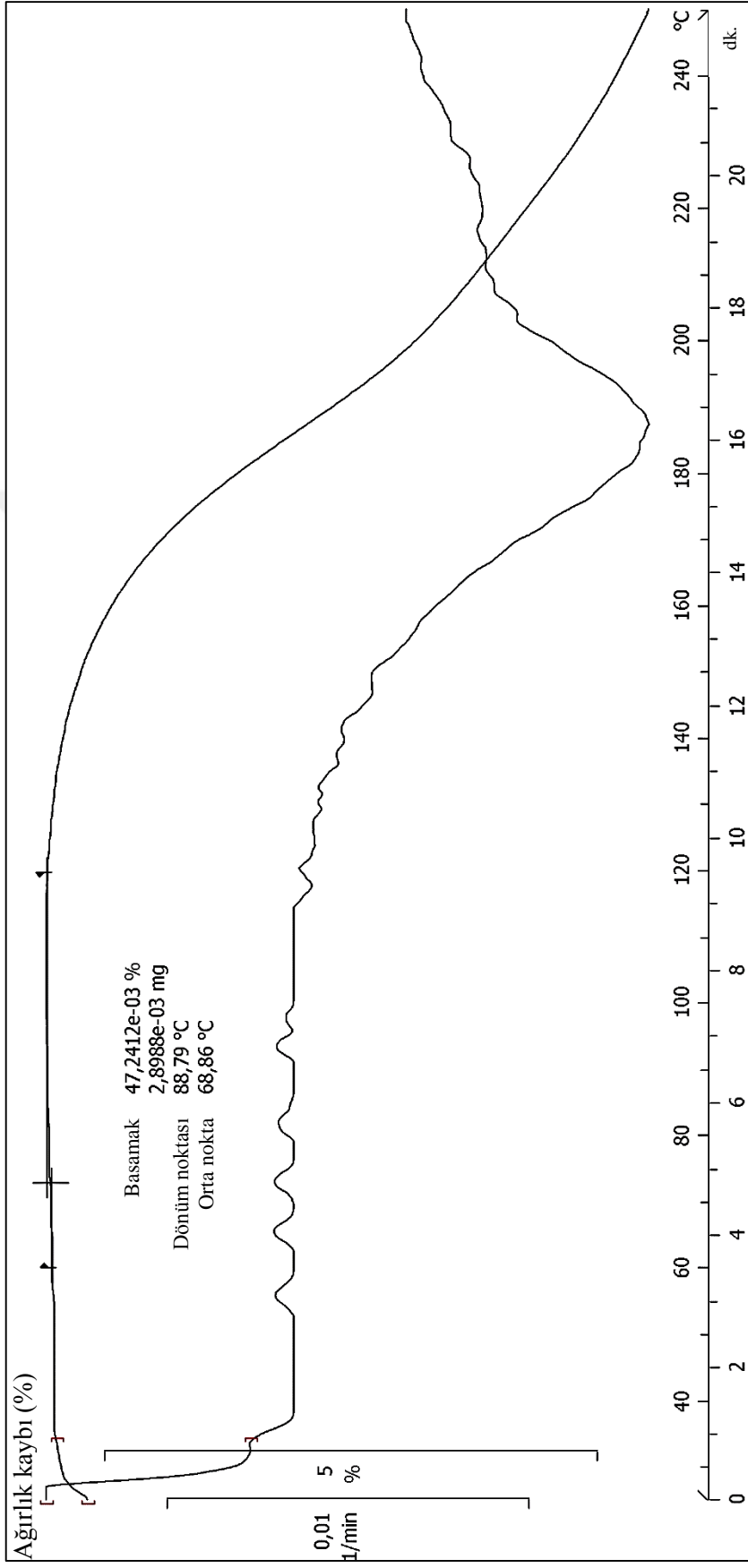
Tablo 4.15. Üretilen KTİ'lere ait, TGA analizi sonucunda ölçülen ağırlık kaybı değerleri.

	Ağırlık kaybı (%)
Sadece siprofloksasin içeren KTİ	TSA*
Siprofloksasin-asetilsistein içeren KTİ	TSA*
Siprofloksasin-dornaz alfa içeren KTİ	0,260±0,017
Sadece levofloksasin içeren KTİ	2,246±0,011
Levofloksasin-asetilsistein içeren KTİ	1,315±0,117
Levofloksasin-dornaz alfa içeren KTİ	3,477±0,054

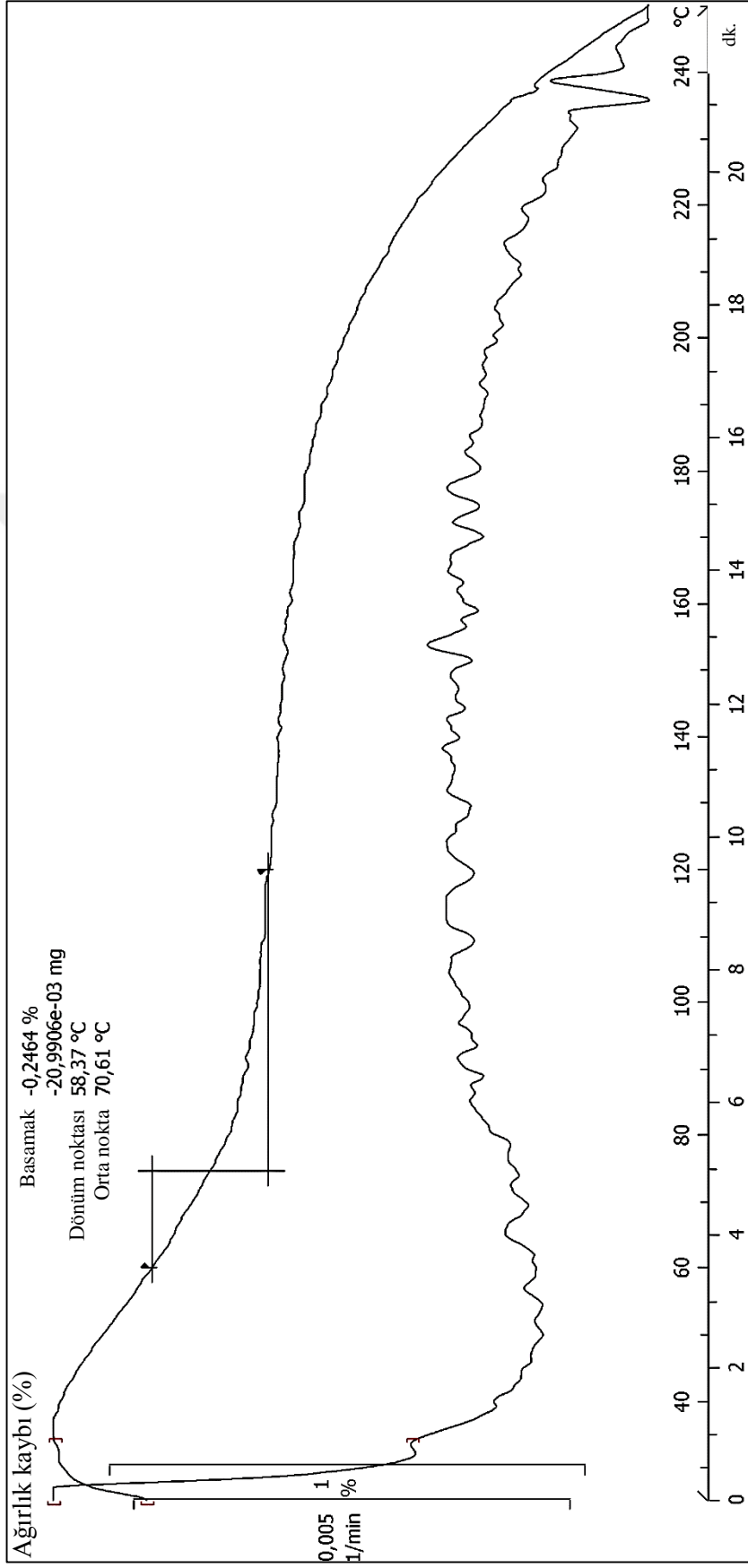
*TSA: Tayin sınırının altında



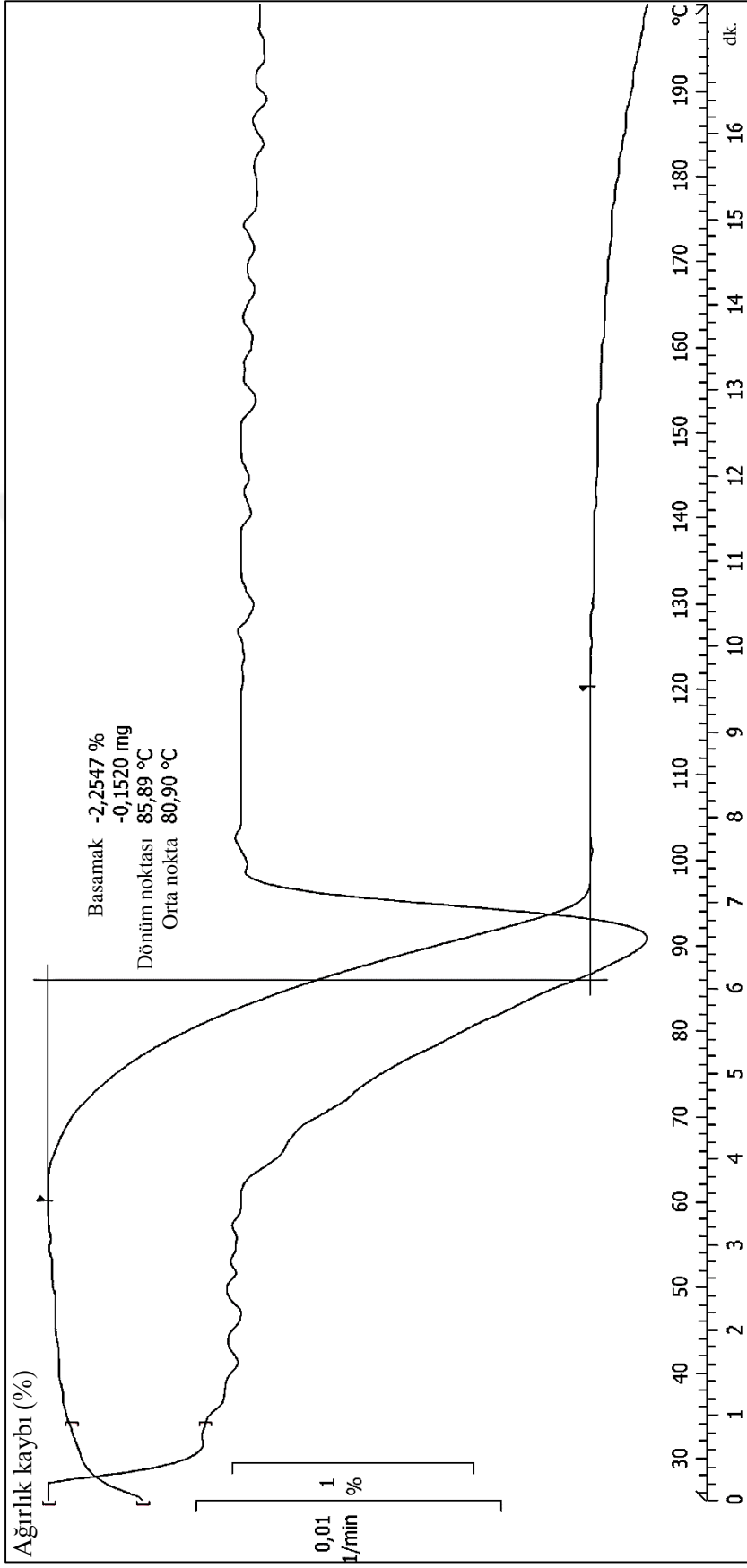
Şekil 4.56. Sadece siprofloksasin içeren KTI'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.



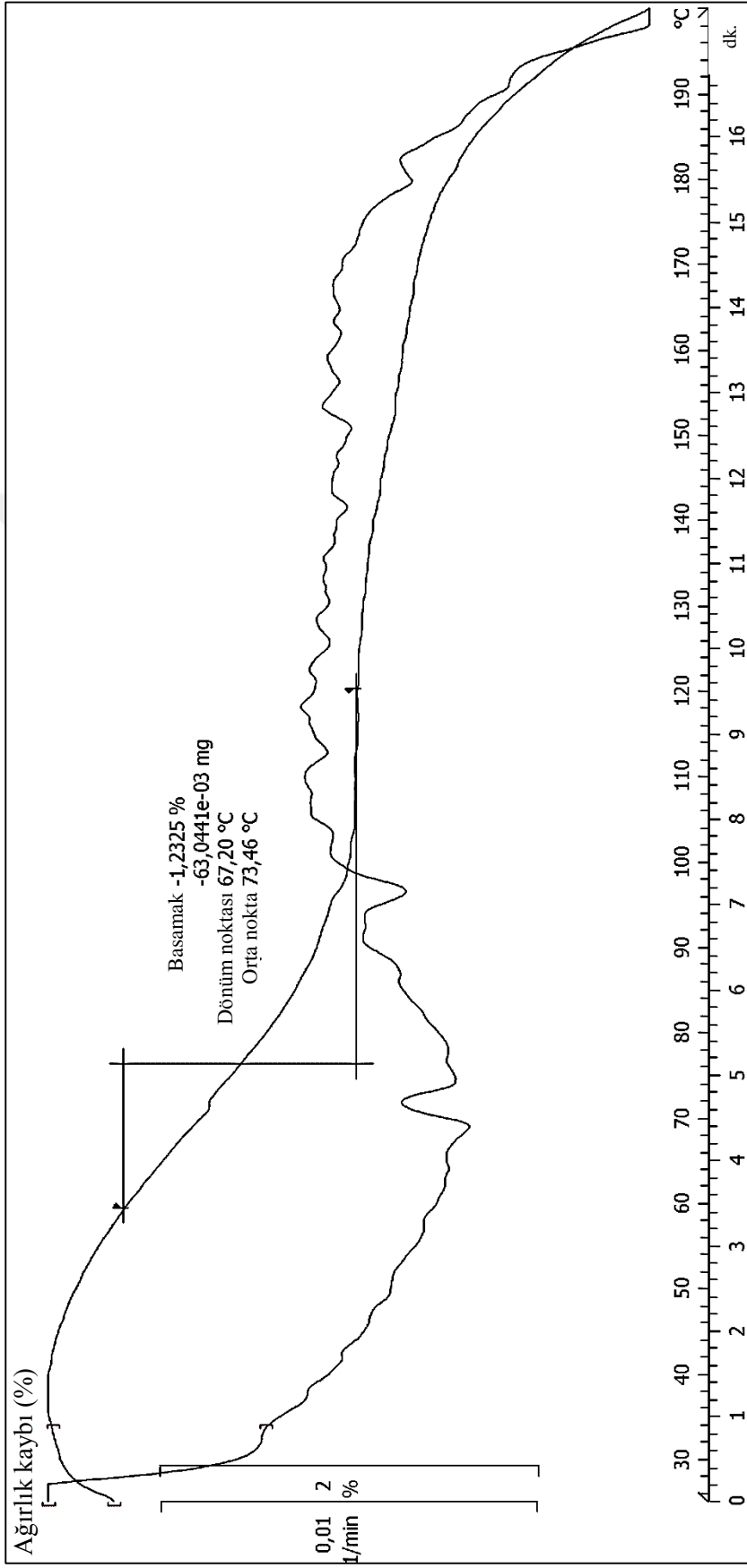
Şekil 4.57. Siprofloksasin-asetilsistein içeren KTI'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.



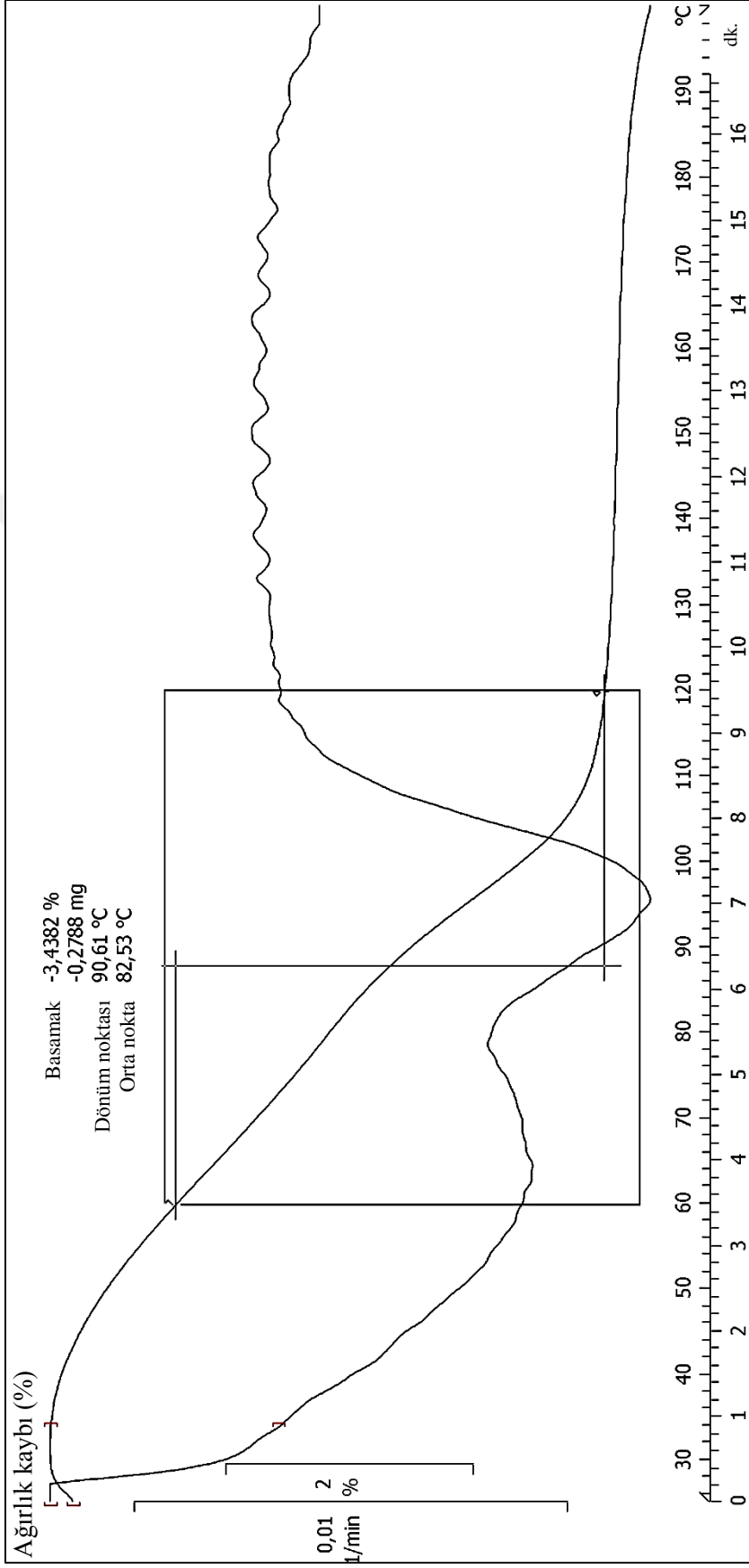
Şekil 4.58. Siprofloksasin-dornaz alfa içeren KTI'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.



Şekil 4.59. Sadece levofloksasin içeren KTI'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.



Şekil 4.60. Levofloksasin-asetilsistein içeren KTI'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.

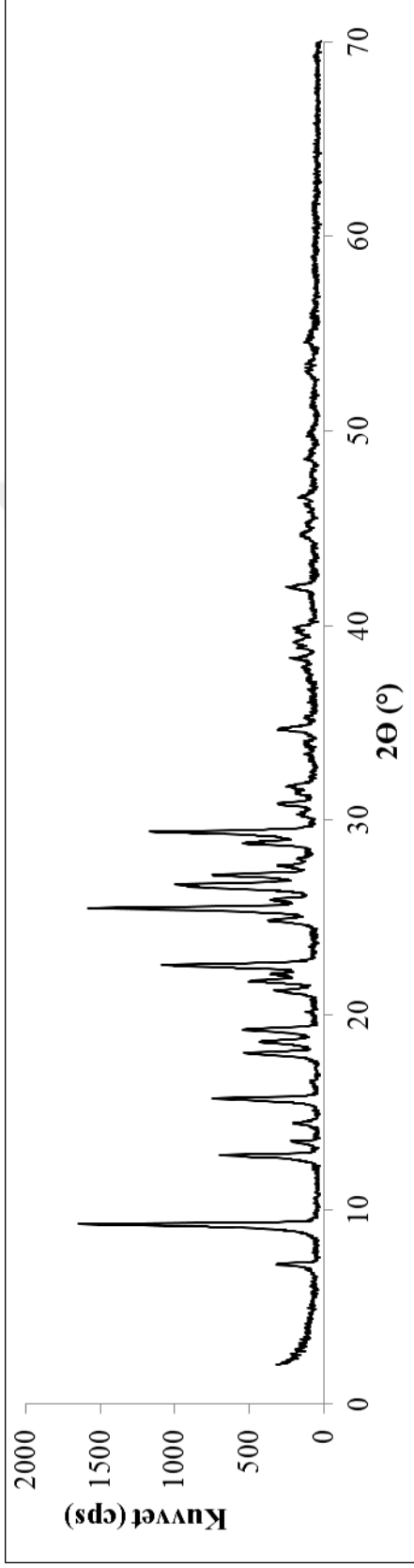


Şekil 4.61. Levofloksasin-dornaz alfa içeren KTI'nin TGA analizi ile elde edilen termogram örneği.

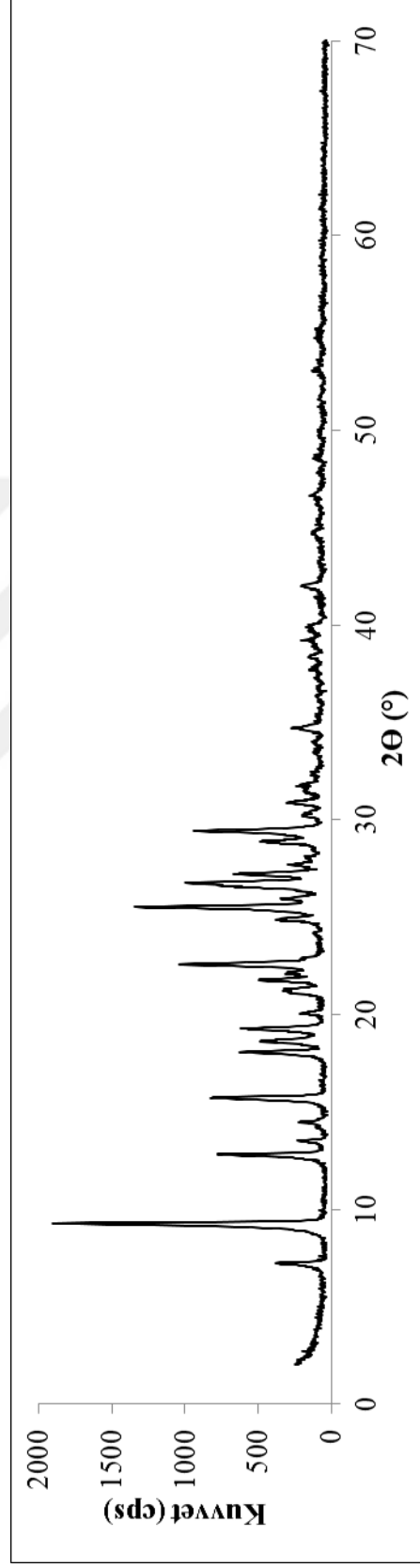
4.4.4. Formülasyonların X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)

Formülasyonların XRD difraktogramı Şekil 4.62.-Şekil 4.67.'de verilmiştir. XRD difraktogramında piklerin görülmesi kristal yapı varlığını gösterir. Amorf yapı varlığında ise, XRD difraktogramında herhangi bir pik gözlenmemektedir.

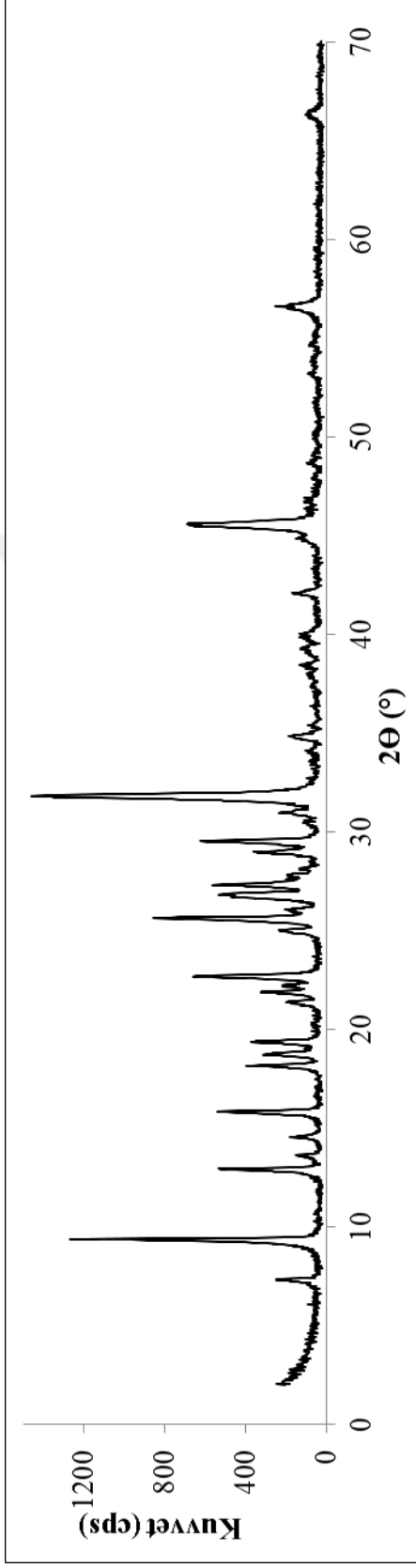




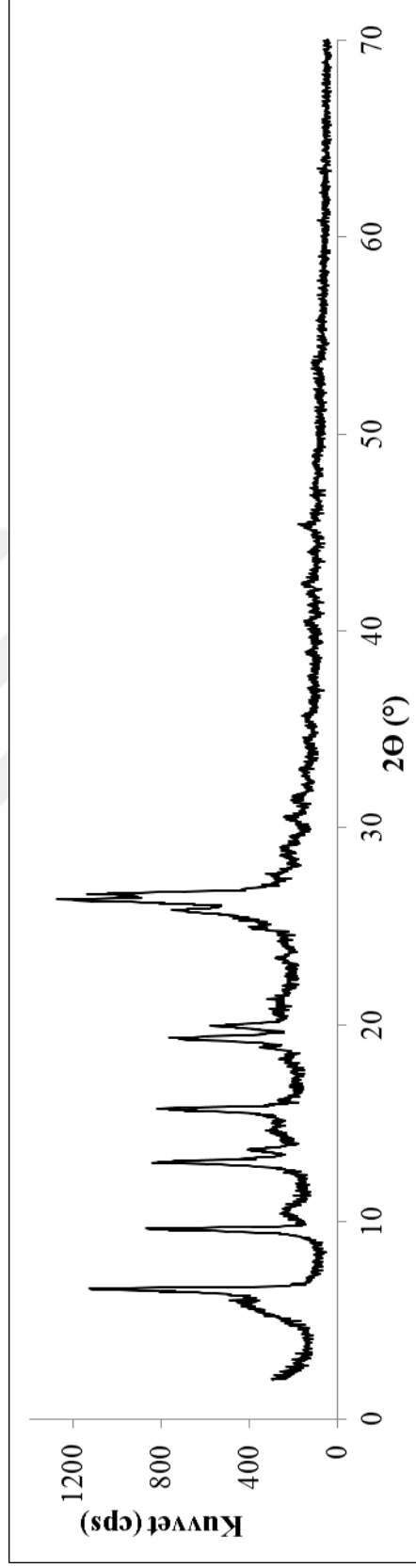
Şekil 4.62. Siprofloksasin içeren kuru toz inhaleler formülasyonunun XRD difraktogramı.



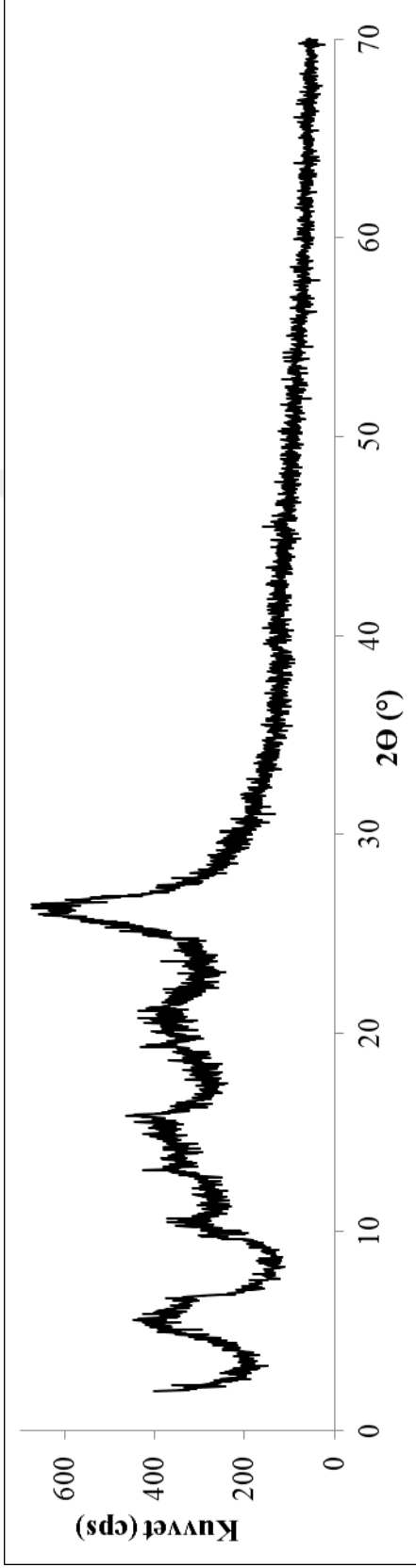
Şekil 4.63. Siprofloksasin ve asetilsistein içeren kuru toz inhaleler formülasyonunun XRD difraktogramı.



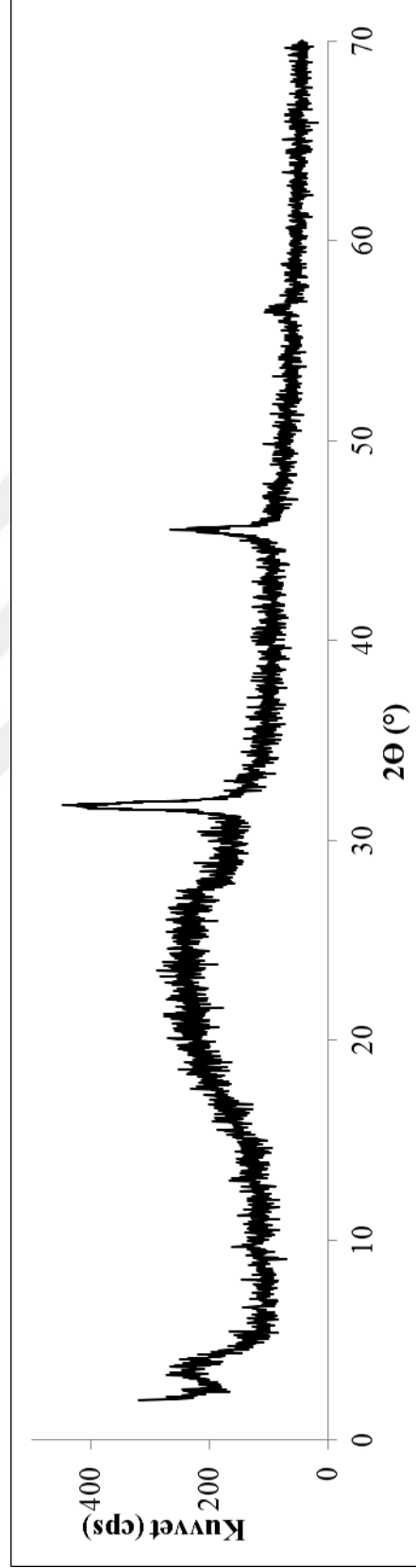
Şekil 4.64. Siprofloksasin ve domaz alfa içeren kuru toz inhaleler formülasyonunun XRD difraktogramı.



Şekil 4.65. Levofloksasin içeren kuru toz inhaleler formülasyonunun XRD difraktogramı.



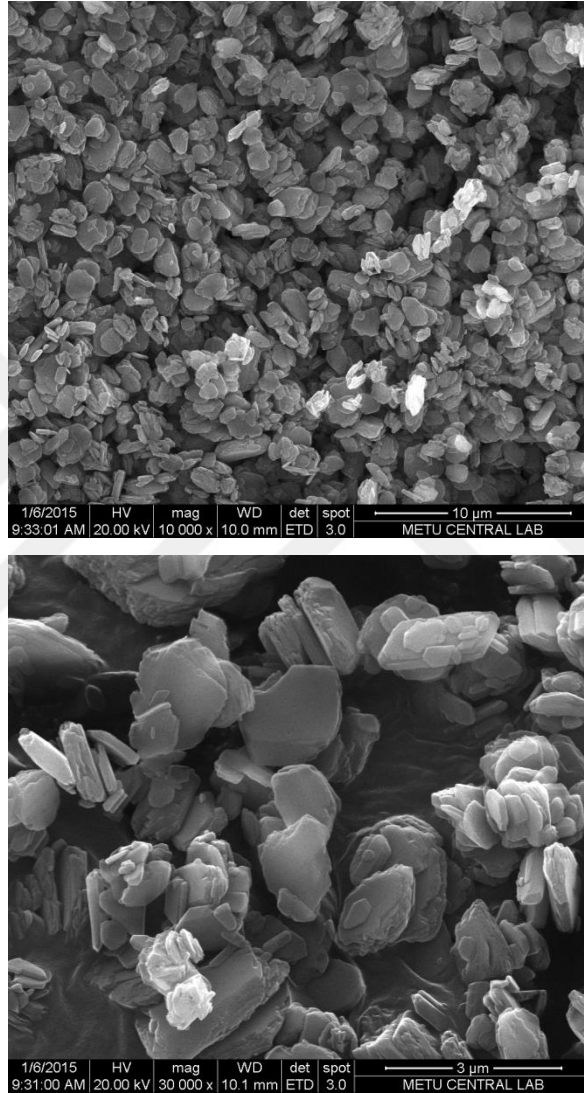
Şekil 4.66. Levofloksasin ve asetilsistein içeren kuru toz inhaler formülasyonunun XRD difraktogramı.



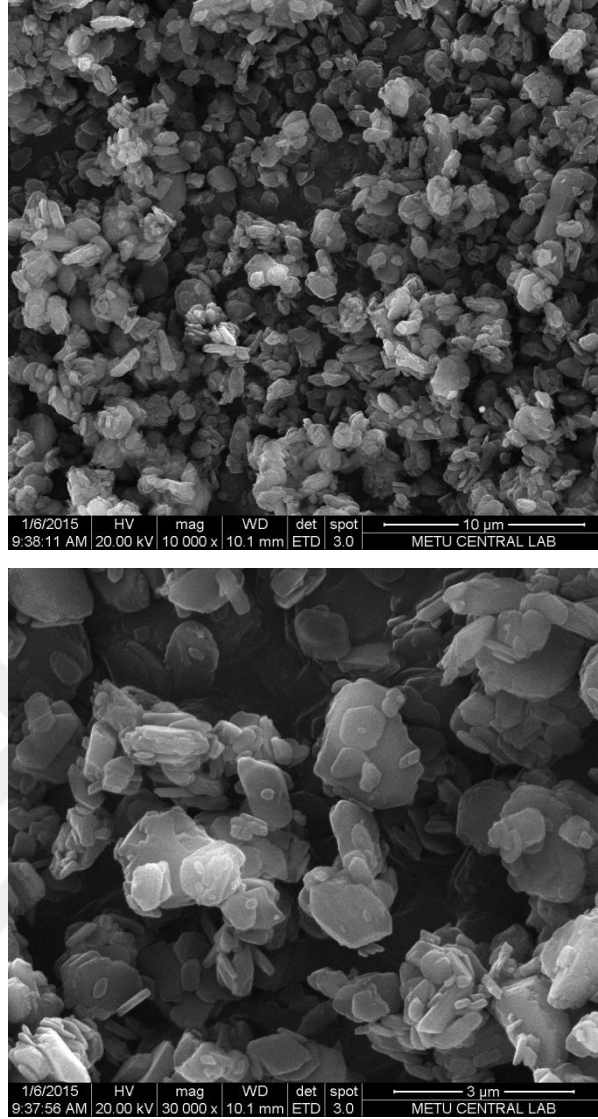
Şekil 4.67. Levofloksasin ve dornaz alfa içeren kuru toz inhaler formülasyonunun XRD difraktogramı.

4.4.5. Formülasyonların Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi (SEM)

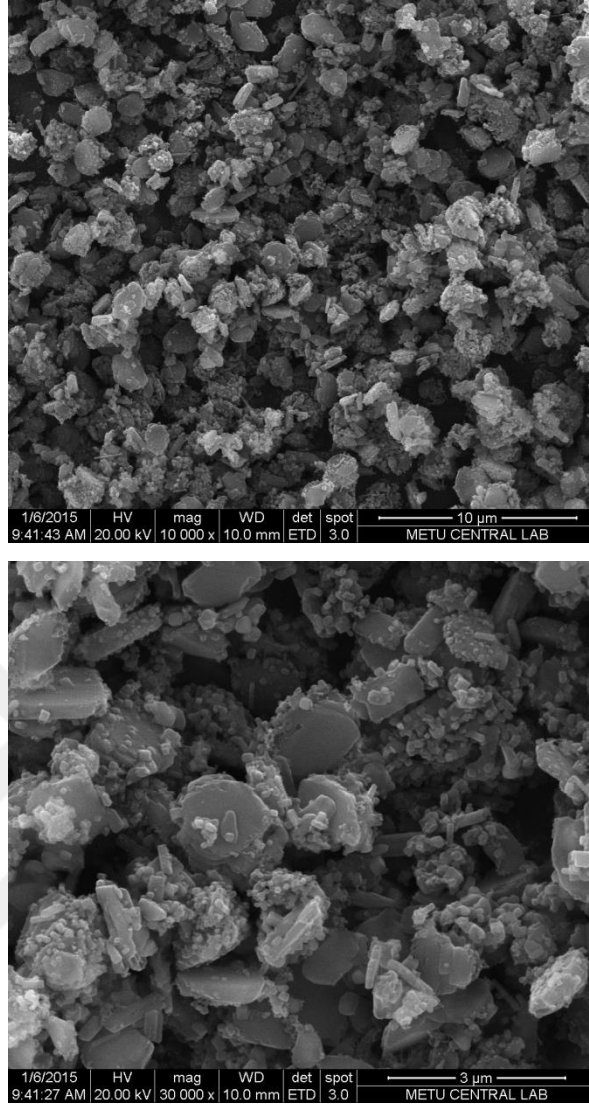
Formülasyonlara ait SEM görüntüleri partikül büyüklüğü dağılımı analizinden elde edilen değerler ile uyumludur (Şekil 4.68.-Şekil 4.73.).



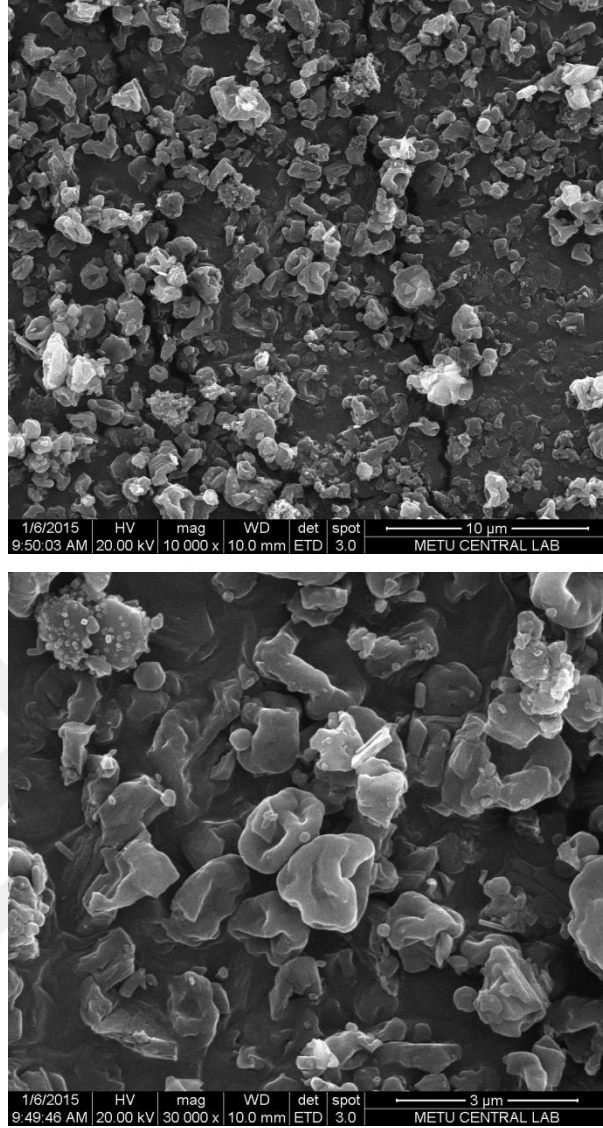
Şekil 4.68. Sadece siprofloksasin içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}=0,111\pm0,009 \mu\text{m}$, $d_{50}=0,787\pm0,009 \mu\text{m}$, $d_{90}=1,926\pm0,099 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS).



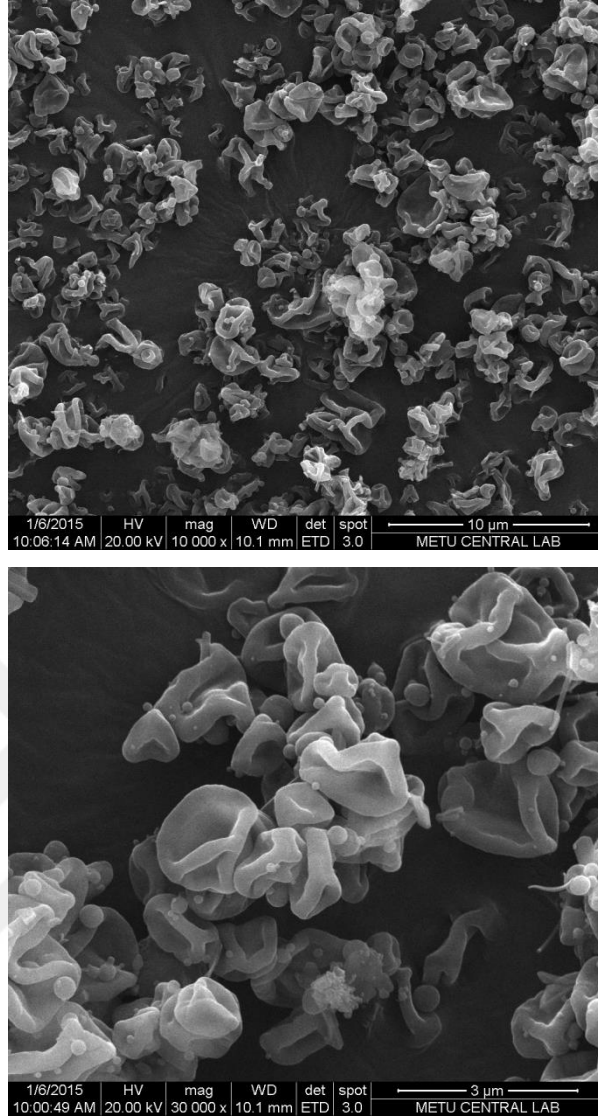
Şekil 4.69. Siprofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}= 0,099\pm0,010 \mu\text{m}$, $d_{50}= 0,726\pm0,028 \mu\text{m}$, $d_{90}= 1,838\pm0,126 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS).



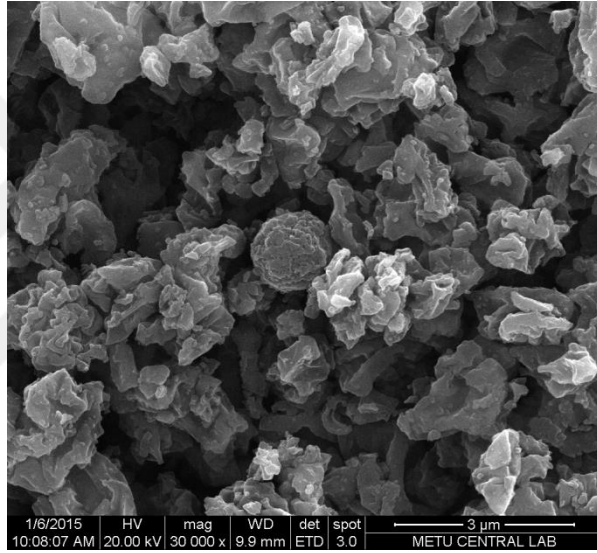
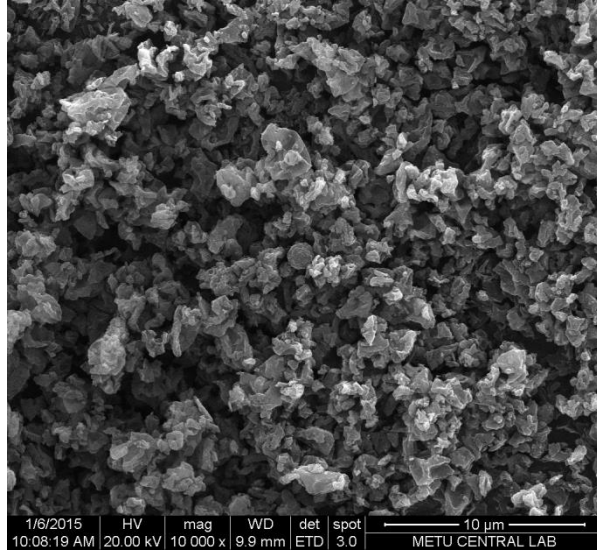
Şekil 4.70. Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10} = 0,087 \pm 0,001 \mu\text{m}$, $d_{50} = 1,358 \pm 0,039 \mu\text{m}$, $d_{90} = 2,490 \pm 0,052 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS).



Şekil 4.71. Sadece levofloksasin içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}=1,348\pm0,002$ μm , $d_{50}=2,100\pm0,003$ μm , $d_{90}=3,445\pm0,012$ μm ; ortalama \pm SS).



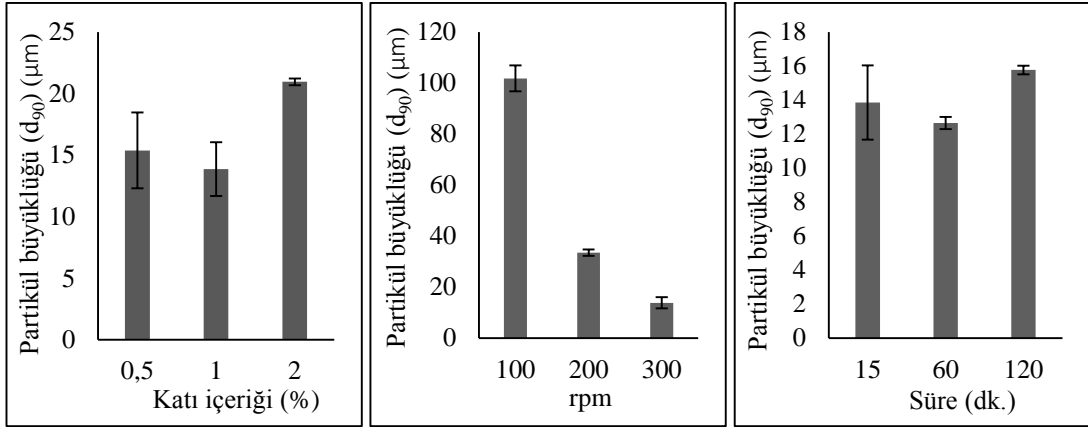
Şekil 4.72. Levofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10}= 1,250\pm0,014 \mu\text{m}$, $d_{50}= 1,986\pm0,029 \mu\text{m}$, $d_{90}= 3,358\pm0,047 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS).



Şekil 4.73. Levofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ formülasyonuna ait SEM görüntüleri (sırasıyla x10000 ve x30000) (Mastersizer ölçüm sonuçları: $d_{10} = 1,326 \pm 0,009 \mu\text{m}$, $d_{50} = 2,142 \pm 0,008 \mu\text{m}$, $d_{90} = 3,673 \pm 0,065 \mu\text{m}$; ortalama \pm SS).

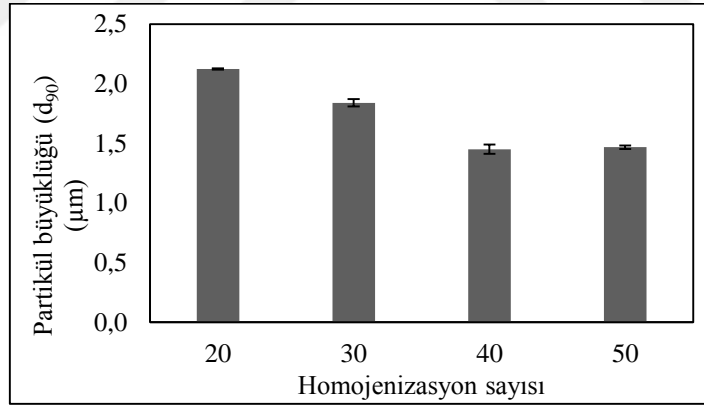
4.4.6. Formülasyonların Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

Ön formülasyon çalışmaları sırasında siprofloksasinin, farklı koşullarda bilyalı değirmen ile öğütülmesi sonrasında elde edilen partikül büyüklüğü değerleri (d_{90}) Şekil 4.74.'te verilmiştir.



Şekil 4.74. Siprofloksasinin, Tablo 3.2.'de verilen koşullarda, bilyalı değirmen ile öğütülmesi sonrası elde edilen partikül büyüklükleri (ortalama±SS, n=6).

İzopropil alkol içinde %1 derişimdeki siprofloksasin süspansiyonunun bilyalı değirmen ile 100 rpm, 60 dk. koşullarında öğütülmesi ile elde edilen süspansiyonun ($d_{10}=1,756 \mu\text{m}$, $d_{50}=5,230 \mu\text{m}$, $d_{90}=21,754 \mu\text{m}$), yüksek basınçlı homojenizatör ile homojenize edilmesi sonucu elde edilen partikül büyüklüğü (d_{90}) Şekil 4.75.'te verilmiştir.



Şekil 4.75. Siprofloksasinin homojenizasyondan sonraki partikül büyüklüğü (d_{90}) (ortalama±SS, n=6).

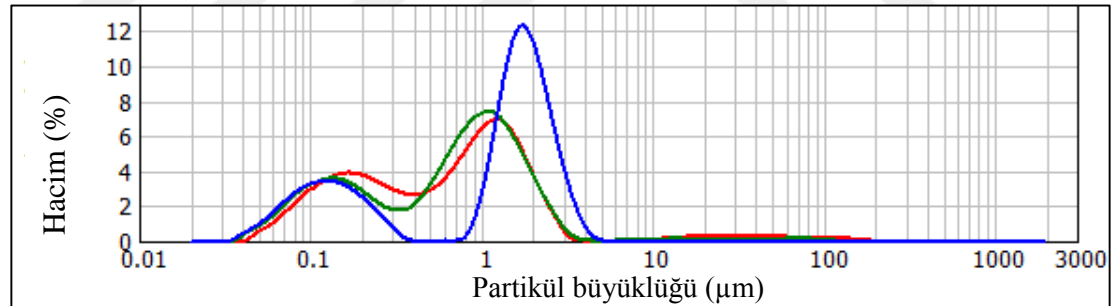
Siprofloksasin içeren formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımı tayini için Malvern Mastersizer Hydro 2000S aleti kullanılmıştır. İç fazın refraktif indeksi 1,655; dış fazın (izopropil alkol) ise 1,390 olarak alınmıştır. Ardışık olarak 6 ölçüm yapılmıştır.

Levofloksasin içeren formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımı tayini için Zetasizer Nano Series Nano ZS aleti kullanılmıştır. İç fazın refraktif indeksi 1,669; dış fazın (dieter) ise 1,350 olarak alınmıştır. Ardışık olarak 6 ölçüm yapılmıştır.

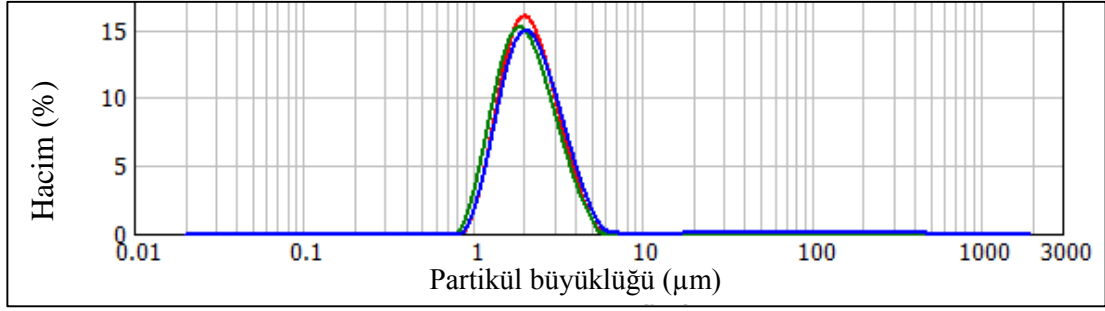
Formülasyonların partikül büyüklüğü değerleri Tablo 4.16. ve Şekil 4.76.-Şekil 4.79.'da verilmiştir.

Tablo 4.16. KTİ formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı (ortalama±SS, n=6).

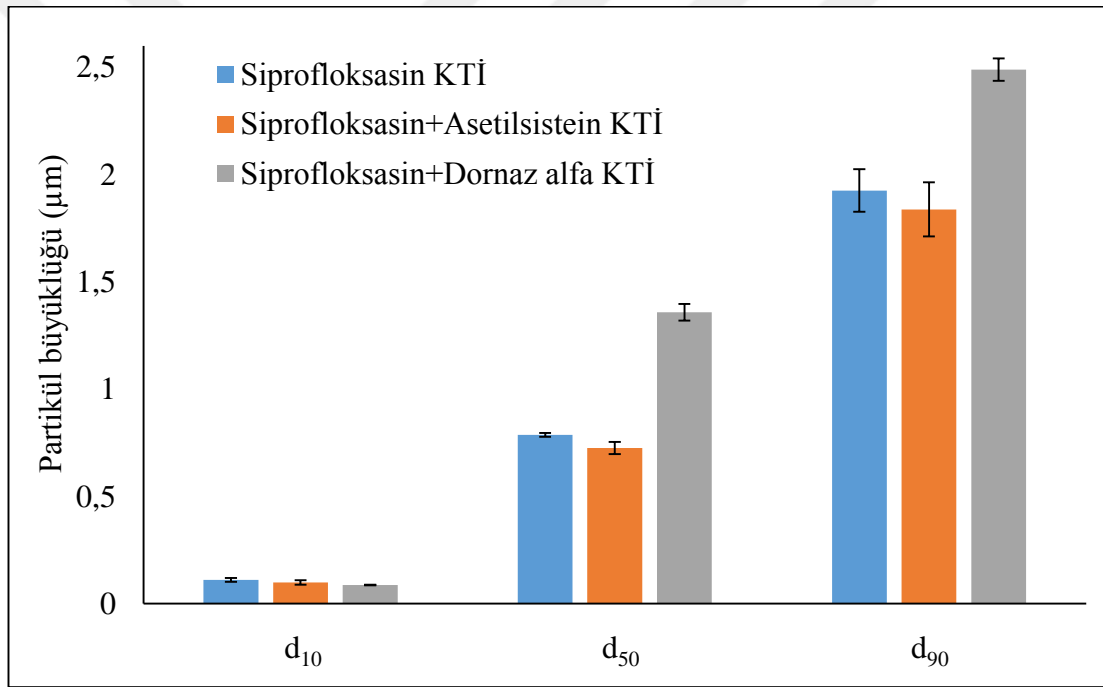
KTİ	d ₁₀ (µm)	d ₅₀ (µm)	d ₉₀ (µm)	Span
Siprofloksasin	0,111±0,009	0,787±0,009	1,926±0,099	2,307±0,089
Siprofloksasin ve asetilsistein	0,099±0,010	0,726±0,028	1,838±0,126	2,410±0,135
Siprofloksasin ve dornaz alfa	0,087±0,001	1,358±0,039	2,490±0,052	1,771±0,043
Levofloksasin	1,348±0,002	2,100±0,003	3,445±0,012	0,998±0,005
Levofloksasin ve asetilsistein	1,250±0,014	1,986±0,029	3,358±0,047	1,062±0,005
Levofloksasin ve dornaz alfa	1,326±0,009	2,142±0,008	3,673±0,065	1,096±0,030



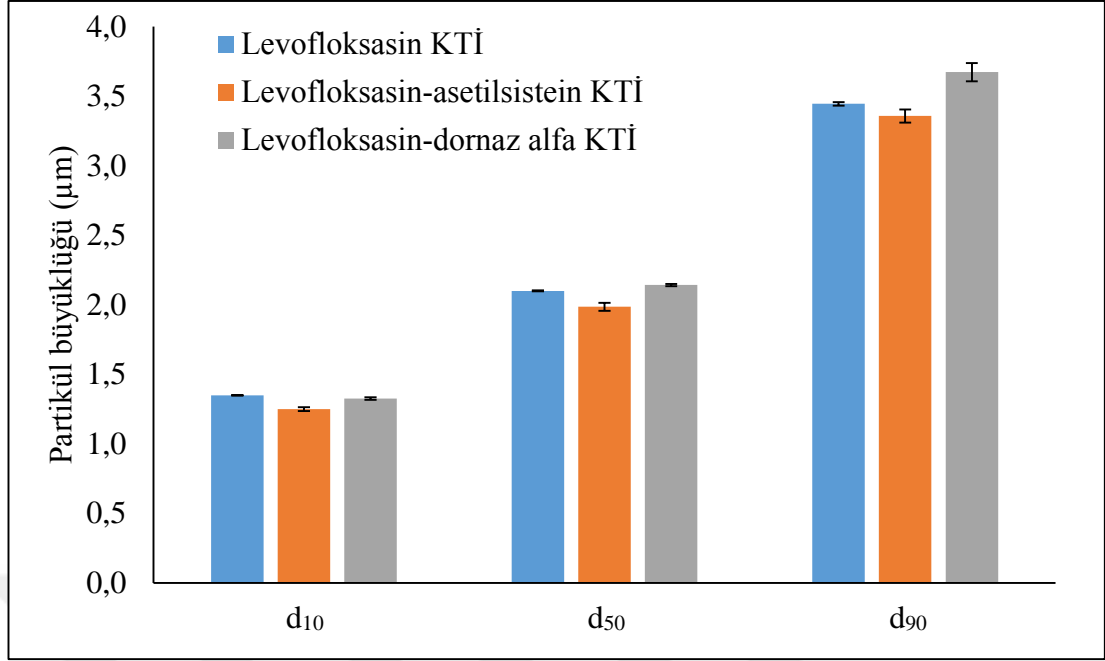
Şekil 4.76. Malvern Mastersizer 2000 ile elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı (kırmızı çizgi-sadece siprofloksasin içeren KTİ, yeşil çizgi-siprofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ, mavi çizgi-siprofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ).



Şekil 4.77. Malvern Mastersizer 2000 ile elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı (yeşil çizgi-sadece levofloksasin içeren KTİ, kırmızı çizgi-levofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ, mavi çizgi-levofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ).



Şekil 4.78. Siprofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı (ortalama±SS, n=6).



Şekil 4.79. Levofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü (ortalama±SS, n=6).

4.5. Formülasyonların Antibiyotik ve Mukolitik İçeriklerinin Tayini

Üretilen inhaler formülasyonlarının, HPLC ve BCA kiti ile analizleri sonucu elde edilen ilaç içerikleri Tablo 4.17.'de verilmiştir.

Tablo 4.17. Üretilen formülasyonların teorik ve pratik ilaç içerikleri.

Formülasyonlar	Antibiyotik içeriği (%)		Mukolitik içeriği (%)	
	Teorik	Pratik	Teorik	Pratik
Sadece siprofloksasin içeren KTİ	100,0	98,0±1,4	-	-
Siprofloksasin-asetilsistein içeren KTİ	90,4	91,0±0,6	9,6	6,6±0,4
Siprofloksasin-dornaz alfa içeren KTİ	76,5	79,5±0,3	2,4	2,6±0,2
Sadece levofloksasin içeren KTİ	100,0	95,5±1,4	-	-
Levofloksasin-asetilsistein içeren KTİ	90,4	83,4±1,0	9,6	5,7±0,5
Levofloksasin-dornaz alfa içeren KTİ	76,5	69,9±0,4	2,4	3,0±0,4

4.6. Çözünürlük Tayini

Yapılan çalışmalarda çözünürlüğün tam doygunluğa ulaştığını anlamak için farklı zamanlarda (1., 6. ve 24. saatler) örnekler alınmış, elde edilen bulgular Tablo 4.18.'de verilmiştir. 1. saat sonunda doygunluk elde edilmezken, 6 ve 24. saatler sonunda elde edilen çözünürlük verilerinin oldukça yakın olması çalışılan süre içinde çözünürlüğün tamamlandığını göstermiştir.

Levofloksasin, BSS'ye göre Sınıf I ilaçtır yani çözünürlüğü yüksek bir maddedir. Bu sebeple levofloksasinin çözünürlüğünü artırmak anlamlı bulunmadığından çözünürlük tayini yapılmamıştır.

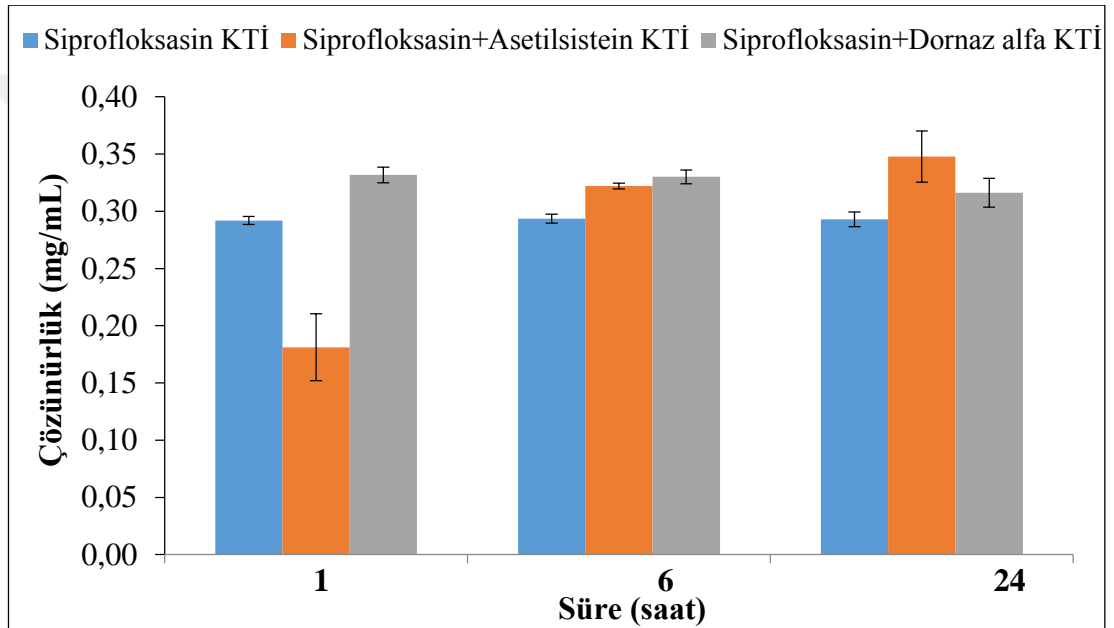
Tablo 4.18. Siprofloksasinin çözünme ortamı olan pH 6,4 ftalat tamponundaki çözünürlük testi sonucu (n=3).

Zaman (saat)	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	Çözünürlük (mg/mL)
1	104,103	0,104
	98,901	0,099
	99,253	0,099
ortalama \pm SS	100,752 \pm 2,907	0,101 \pm 0,003
6	300,045	0,300
	311,349	0,311
	313,583	0,314
ortalama \pm SS	308,326 \pm 7,258	0,308 \pm 0,007
24	314,711	0,315
	327,008	0,327
	329,811	0,330
ortalama \pm SS	323,843 \pm 8,032	0,324 \pm 0,008

Formülasyondaki mukolitiklerin, antibiyotiklerin çözünürlüğü üzerine etkisini incelemek amacıyla siprofloksasin içeren formülasyonlara çözünürlük deneyi yapılmıştır. Çözünürlük verileri oldukça yakın bulunmuştur (Tablo 4.19., Şekil 4.80.).

Tablo 4.19. KTİ formülasyonları içerisindeki siprofloksasinin pH 6,4 ftalat tamponunda 1, 6 ve 24. saatlerdeki çözünürlük değerleri (ortalama±SS, n=3).

Zaman (saat)	Kuru Toz İnhaler Formülasyon		
	Siprofloksasin (mg/mL)	Siprofloksasin Asetilsistein (mg/mL)	Siprofloksasin Dornaz alfa (mg/mL)
1	0,292±0,004	0,181±0,029	0,332±0,007
6	0,294±0,004	0,322±0,003	0,330±0,006
24	0,293±0,006	0,348±0,022	0,316±0,013



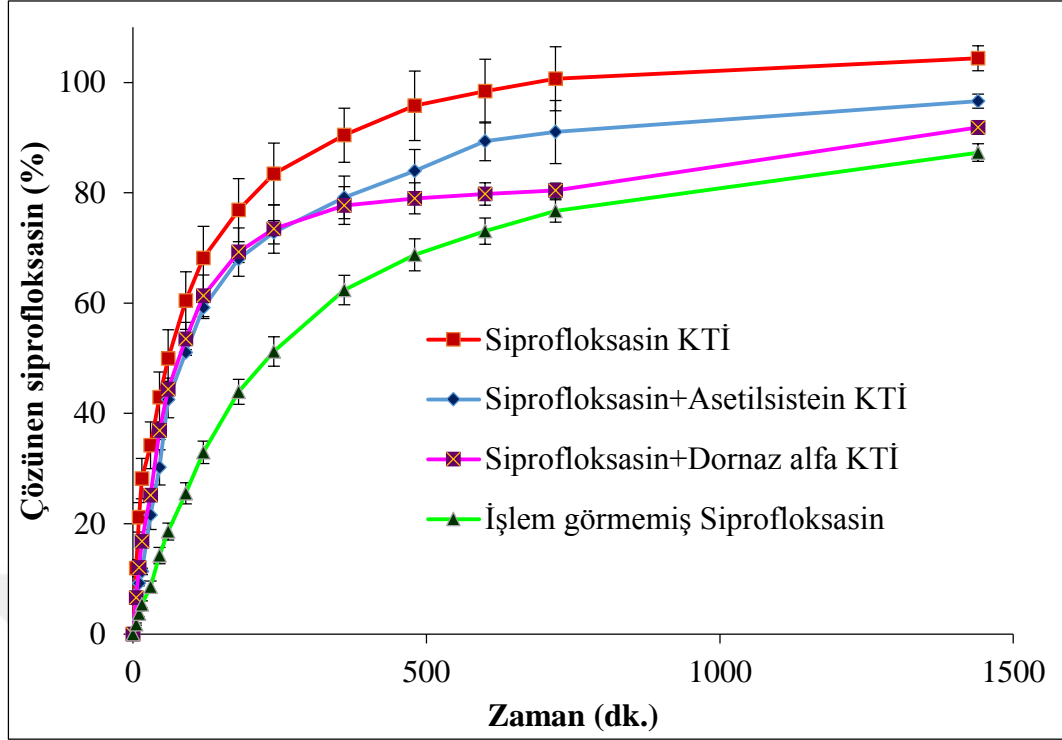
Şekil 4.80. KTİ formülasyonları içerisindeki siprofloksasinin pH 6,4 ftalat tamponunda 1, 6 ve 24. saatlerdeki çözünürlük değerleri (ortalama±SS, n=3).

4.7. Çözünme Deneyi

Siprofloksasin içeren KTİ'ler ile yapılan çözünme deneyleri sonucunda çözünen siprofloksasin yüzde değerleri zamana karşı grafiğe aktarılmış, sonuçlar Tablo 4.20. ve Şekil 4.81.'de verilmiştir.

Tablo 4.20. Siprofloksasin içeren kuru toz inhaler formülasyonlarında siprofloksasinin zamana karşı % çözünen miktarları (ortalama±SS, n=3).

Zaman (dk.)	% Çözünen Siprofloksasin			
	İşlem görmemiş siprofloksasin	Siprofloksasin KTİ	Siprofloksasin Asetilsistein KTİ	Siprofloksasin Dornaz alfa KTİ
5	1,792±0,216	11,921±1,580	7,174±0,148	6,600±0,312
10	3,686±0,498	21,160±2,661	9,213±0,464	12,018±0,432
15	5,368±0,653	28,182±3,674	11,353±0,562	16,824±0,498
30	8,546±1,037	34,211±4,227	21,575±2,629	25,161±0,838
45	14,235±1,476	42,904±4,616	30,204±3,203	36,864±1,616
60	18,583±1,529	49,926±5,275	39,580±3,310	44,362±2,019
90	25,513±1,939	60,459±5,209	48,246±0,507	53,517±3,006
120	32,936±2,045	68,162±5,746	55,499±2,023	61,320±3,773
180	43,940±2,265	76,856±5,725	64,379±0,655	69,253±4,405
240	51,242±2,681	83,413±5,594	69,763±2,128	73,432±4,362
360	62,364±2,664	90,448±4,916	76,597±3,864	77,671±3,427
480	68,748±2,887	95,804±6,298	81,770±3,905	79,000±2,794
600	73,048±2,381	98,419±5,776	86,975±3,531	79,800±2,022
720	76,684±2,028	100,679±5,791	89,306±5,717	80,401±1,383
1440	87,280±1,593	104,375±2,257	96,610±1,287	91,848±1,208



Şekil 4.81. Siprofloksasin içeren formülasyonların ve işlem görmemiş siprofloksasinin pH 6,4 ftalat tamponu çözünme ortamında zamana karşı % çözünen siprofloksasin miktarları (ortalama±SS, n=3).

Weibul eşitliği ile çözünme süresinin hesaplanması amacıyla, çözünme verileri kullanılarak her formülasyon için doğru denklemi elde edilmiştir.

Çözünme zamanları, doğru denklemlerinden elde edilen a ve b değerleri kullanılarak ($y=bx+a$), Eşitlik 3.3. ile hesaplanmıştır (Tablo 4.21.).

Tablo 4.21. Weibul eşitliği kullanılarak elde edilen işlem görmemiş siprofloksasin ve siprofloksasin içeren KTİ'lerin %63,2'sinin çözünmesi için gereken süreler.

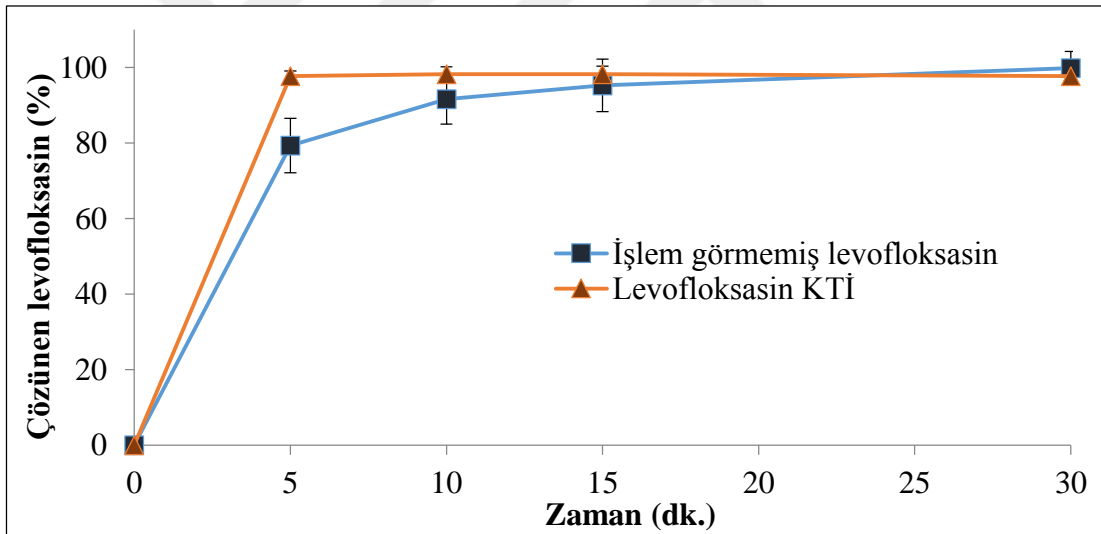
	Çözünme zamanı (sa.)
İşlem görmemiş siprofloksasin	5,892±0,493
Sadece siprofloksasin içeren KTİ	1,639±0,514
Siprofloksasin-asetilsistein KTİ	2,852±0,078
Siprofloksasin-dornaz alfa KTİ	2,762±0,374

Çözünme deneyleri sonucunda çözünen levofloksasin (%) değerleri zamana karşı grafiğe aktarılmış, işlem görmemiş levofloksasin ve sadece levofloksasin içeren KTİ formülasyonunun hızla çözündüğü gözlemlenmiştir (Tablo 4.22., Şekil 4.82.). Bu

nedenle Weibull eşitliği uygulanmamış ve diğer levofloksasin içeren formülasyonlara (levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ) çözünme deneyi yapılmamıştır.

Tablo 4.22. Levofloksasin içeren formülasyon ve işlem görmemiş levofloksasinin pH 6,4 fosfat tamponu çözünme ortamında zamana karşı % çözünen levofloksasin miktarları (ortalama±SS, n=3).

Zaman (dk.)	% Çözünen Levofloksasin	
	İşlem görmemiş levofloksasin	Levofloksasin KTİ
5	79,313±7,213	97,731±1,386
10	91,592±6,542	98,275±1,917
15	95,282±6,955	98,244±2,082
30	99,858±4,396	97,770±1,394



Şekil 4.82. Levofloksasin içeren formülasyon ve işlem görmemiş levofloksasinin pH 6,4 fosfat tamponu çözünme ortamında zamana karşı % çözünen levofloksasin miktarları grafiği (ortalama±SS, n=3).

4.8. Aerodinamik Ölçütler

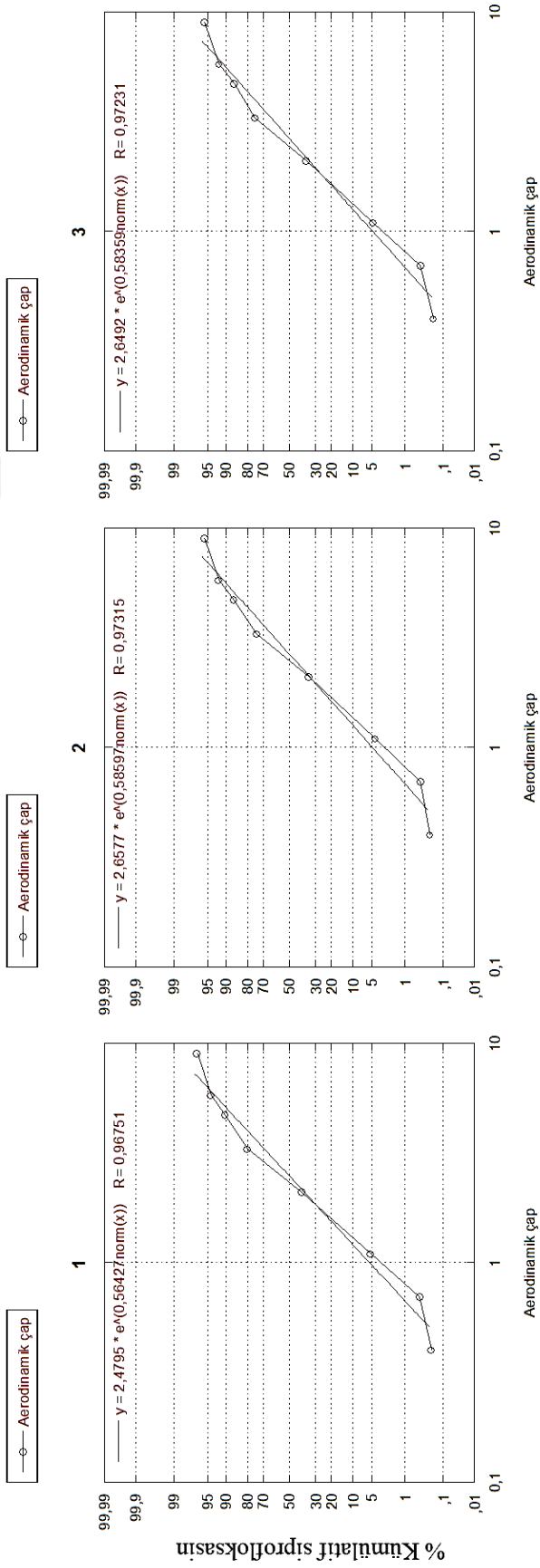
ACI kullanılarak, siprofloksasin içeren KTI formülasyonundan elde edilen ölçütler Tablo 4.23.-Tablo 4.25. ve Şekil 4.83.-Şekil 4.84.'te verilmiştir.

Tablo 4.23. Sadece siprofloksasin içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı (mg).

Formülasyon	İnhaler aygıtını terk eden toz miktarı (mg)			
	1. puf	2. puf	3. puf	Toplam
1	14,80	1,20	0,70	16,70
2	18,40	2,30	0,80	21,50
3	17,00	1,40	1,30	19,70
Ortalama±SS	16,73±1,81	1,63±0,59	0,93±0,32	19,30±2,42

Tablo 4.24. Sadece siprofloksasin içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan siprofloksasin baz miktarları (mg).

	Uygulama (% olarak)			Ortalama ± SS	Uygulama (mg olarak)			Ortalama ± SS
	1	2	3		Tutulan (mg)	Tutulan (mg)	Tutulan (mg)	
Filtre	0,111	0,132	0,107	0,117±0,014	0,028	0,034	0,028	0,030±0,003
Düzey 6	0,117	0,095	0,133	0,115±0,019	0,030	0,024	0,034	0,029±0,005
Düzey 5	2,398	2,092	2,429	2,306±0,187	0,611	0,535	0,628	0,591±0,050
Düzey 4	18,221	16,652	18,270	17,714±0,921	4,646	4,257	4,721	4,542±0,249
Düzey 3	20,375	21,707	22,188	21,423±0,939	5,196	5,550	5,734	5,493±0,274
Düzey 2	5,167	6,651	6,286	6,035±0,773	1,318	1,700	1,624	1,547±0,203
Düzey 1	2,135	2,997	3,189	2,774±0,562	0,544	0,766	0,824	0,712±0,148
Düzey -0	1,297	1,865	1,992	1,718±0,370	0,331	0,477	0,515	0,441±0,097
Düzey -1	1,649	2,369	2,496	2,171±0,457	0,421	0,606	0,645	0,557±0,120
Boğaz	2,942	3,455	3,500	3,299±0,310	0,750	0,883	0,905	0,846±0,084
Aygit	45,589	41,986	39,411	42,329±3,103	11,625	10,734	10,185	10,848±0,727



Şekil 4.83. Siprofloksasin içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif siprofloksasin değerleri (n=3).

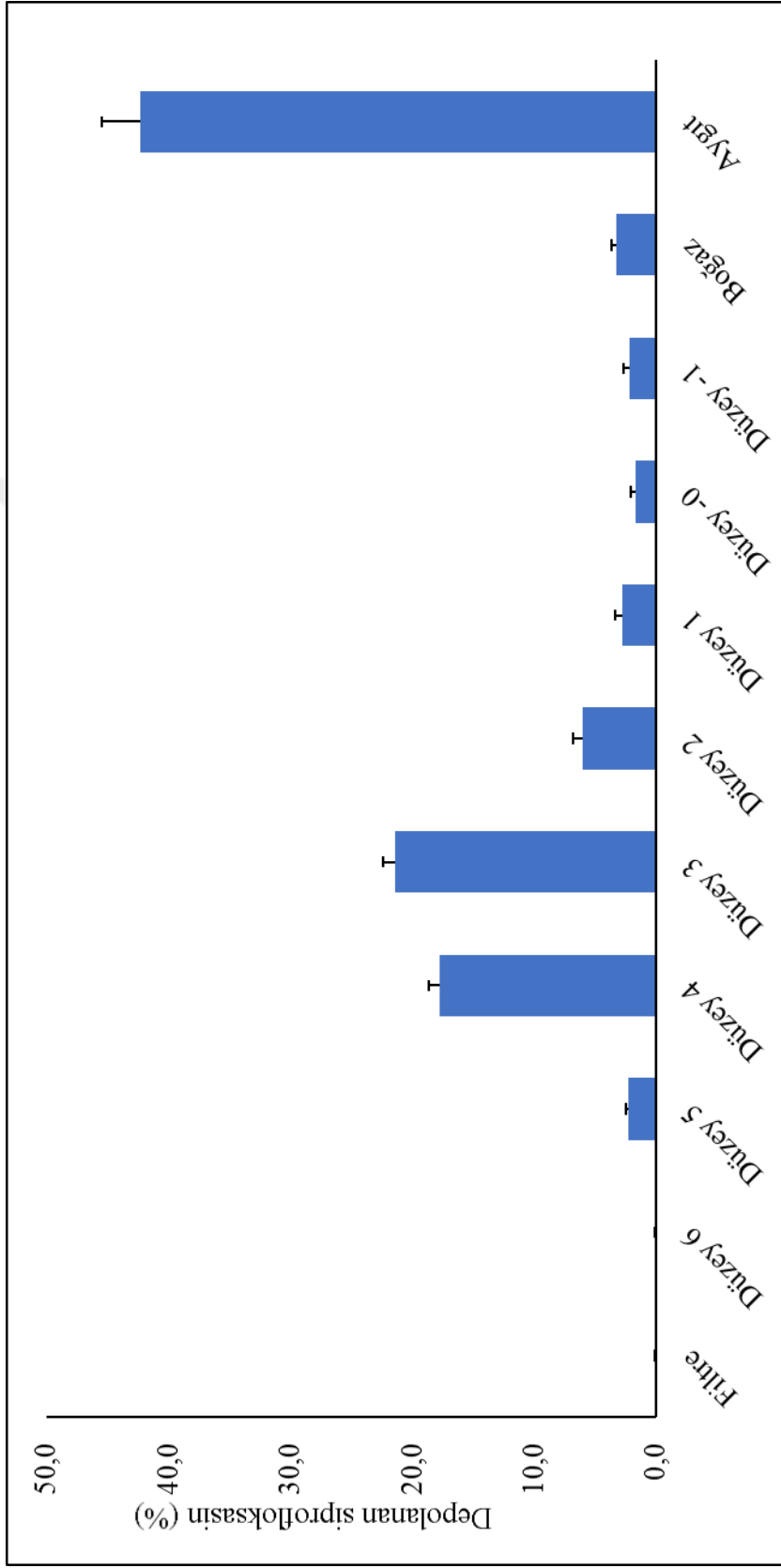
Tablo 4.25. Siprofloksasin içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları.

	Yüklenen doz	Emitted doz*	Emitted**	KOAC***	İnce partikül dozu < 5µm	İnce partikül fraksiyonu < 5µm
Uygulama	(mg)	(mg)	(%)	(µm)	(mg)	(%)
1	27,439	13,875	50,565	2,480	11,720	84,472
2	27,565	14,832	53,807	2,658	11,989	80,833
3	27,523	15,658	56,889	2,649	12,713	81,194
Ortalama ±SS	27,509 ±0,064	14,788 ±0,892	53,754 ±3,162	2,595 ±0,101	12,141 ±0,514	82,166 ±2,005

*İnhaler aygıtını terk eden siprofloksasin baz miktarı

**İnhaler aygıtını terk eden yüzde siprofloksasin miktarı

***Kütle ortalama aerodinamik çap



Şekil 4.84. Sadece siprofloksasin içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen siprofloksasin yüzdesi (ortalama±SS, n=3).

ACI kullanılarak, siprofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ formülasyonundan elde edilen parametreler Tablo 4.26.-Tablo 4.28. ve Şekil 4.85.-Şekil 4.86.'da verilmiştir.

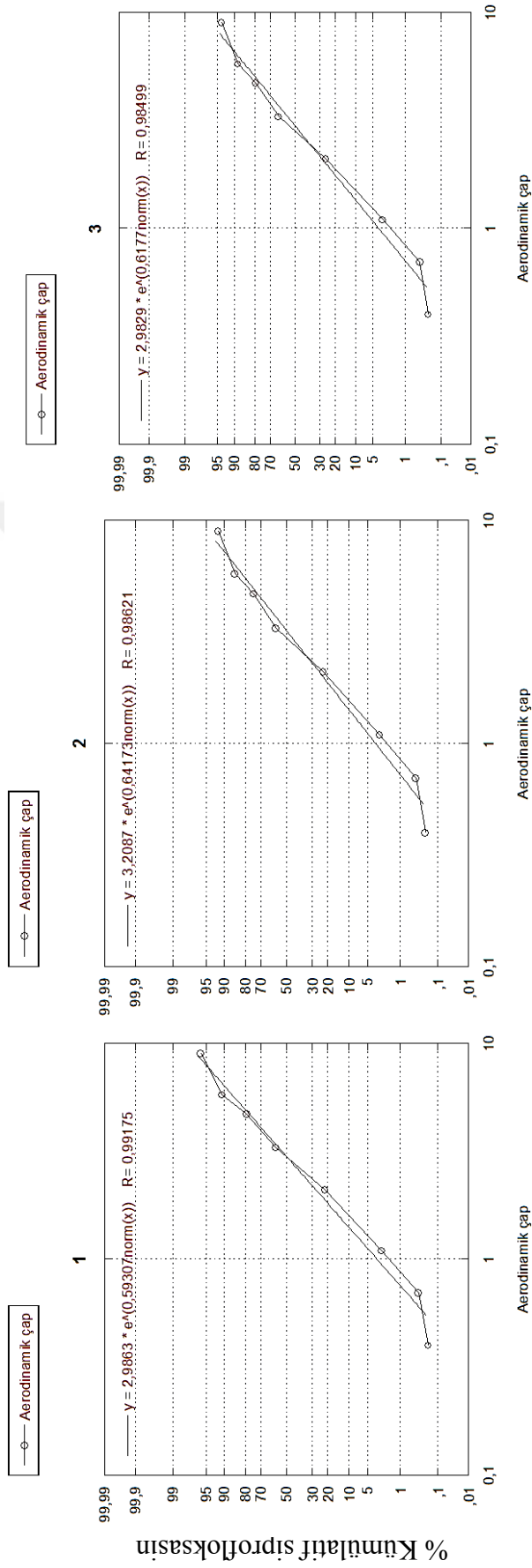
Tablo 4.26. Siprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhale aygıtını terk eden toz miktarı.

Formülasyon	İnhale aygıtını terk eden toz miktarı (mg)			
	1. puf	2. puf	3. puf*	Toplam
1	19,40	0,30	-	19,70
2	19,20	1,80	-	21,00
3	19,40	3,00	-	22,40
Ortalama±SS	19,33±0,12	1,70±1,35	-	21,03±1,35

*Toplam ağırlıkta herhangi bir değişiklik olmamıştır.

Tablo 4.27. Siprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan siprofloksasin miktarları (mg).

	Uygulama (% olarak)			Ortalama ± SS	Uygulama (mg olarak)			Ortalama ± SS
	1	2	3		1	2	3	
Filtre	Tutulana (%)	Tutulana (%)	% Tutulana (%)	0,128±0,009	Tutulana (mg)	Tutulana (mg)	Tutulana (mg)	0,032±0,002
	0,117	0,131	0,134	0,100±0,005	0,030	0,033	0,034	0,025±0,001
Düzey 6	0,098	0,106	0,098	1,454±0,098	0,025	0,027	0,025	0,368±0,024
Düzey 5	1,381	1,416	1,564	11,916±0,780	0,353	0,355	0,397	3,020±0,205
Düzey 4	11,596	11,347	12,805	21,479±1,005	2,967	2,847	3,246	5,445±0,307
Düzey 3	22,592	20,636	21,208	10,248±1,695	5,781	5,179	5,376	2,600±0,452
Düzey 2	12,193	9,468	9,084	5,984±0,962	3,120	2,376	2,303	1,517±0,253
Düzey 1	6,964	5,948	5,040	3,301±0,365	1,782	1,493	1,278	0,836±0,086
Düzey -0	3,203	3,705	2,996	3,491±1,103	0,820	0,930	0,759	0,883±0,271
Düzey -1	2,450	4,648	3,376	3,695±1,122	0,627	1,166	0,856	0,938±0,294
Boğaz	4,991	3,029	3,066	38,203±3,323	1,277	0,760	0,777	9,678±0,777
Aygit	34,415	39,566	40,628		8,806	9,929	10,299	



Şekil 4.85. Siprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif siprofloksasin değerleri (n=3).

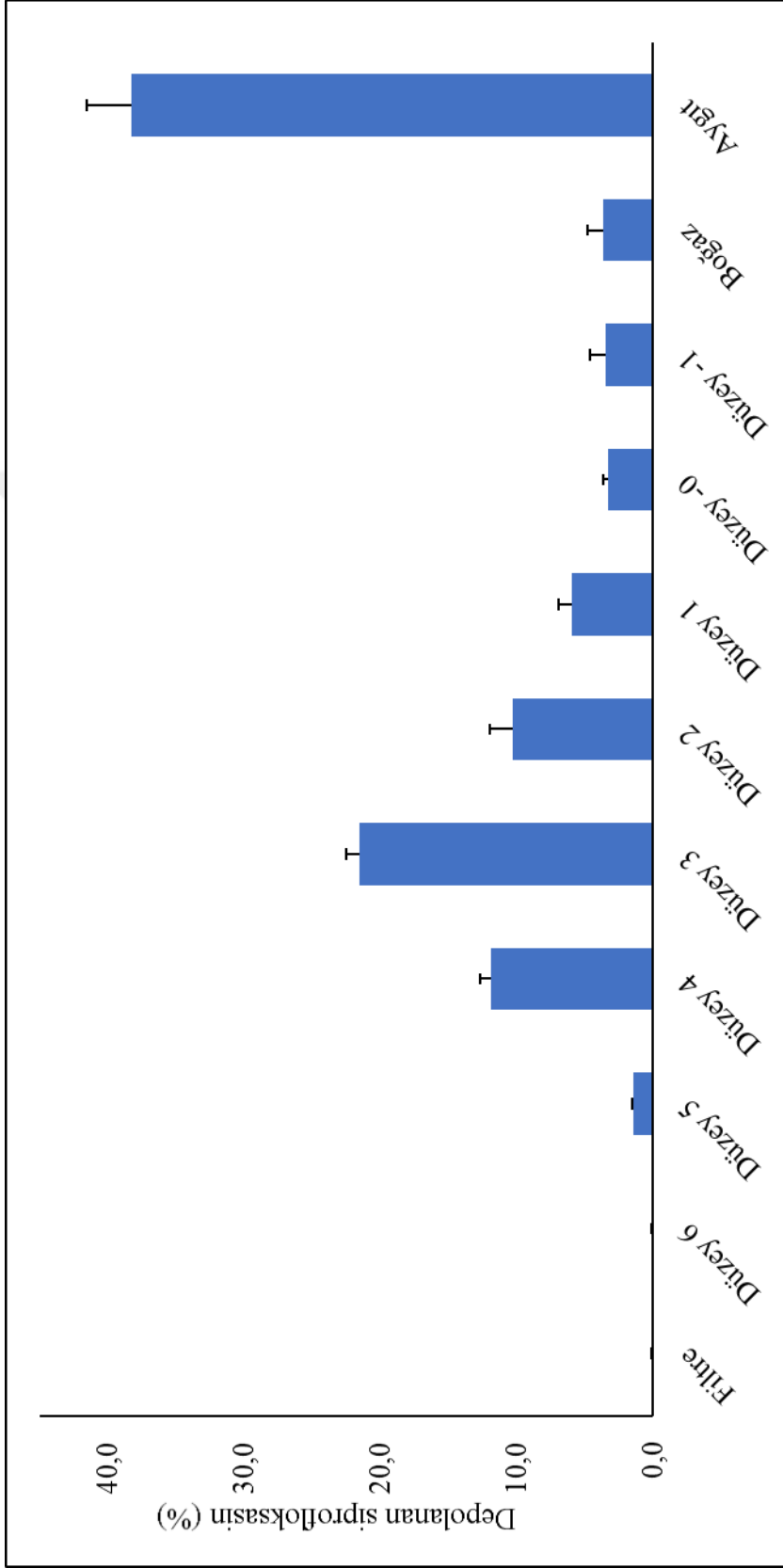
Tablo 4.28. Siprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları.

	Yüklenen doz	Emitted doz*	Emitted**	KOAÇ***	İnce partikül dozu < 5µm	İnce partikül fraksiyonu < 5µm
Uygulama	(mg)	(mg)	(%)	(µm)	(mg)	(%)
1	26,964	16,782	62,240	2,986	12,520	74,605
2	26,729	15,166	56,738	3,209	10,879	71,734
3	26,964	15,050	55,817	2,983	11,396	75,717
Ortalama ± SS	26,886 ±0,135	15,666 ±0,968	58,265 ±3,473	3,059 ±0,129	11,598 ±0,839	74,019 ±2,055

*İnhaler aygıtını terk eden siprofloksasin baz miktarı

**İnhaler aygıtını terk eden yüzde siprofloksasin miktarı

***Kütle ortalama aerodinamik çap



Şekil 4.86. Siprofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen siprofloksasin yüzdesi (ortalama \pm SS, n=3).

ACI kullanılarak, siprofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ formülasyonundan elde edilen parametreler Tablo 4.29.-Tablo 4.31. ve Şekil 4.87.-Şekil 4.88.'de verilmiştir.

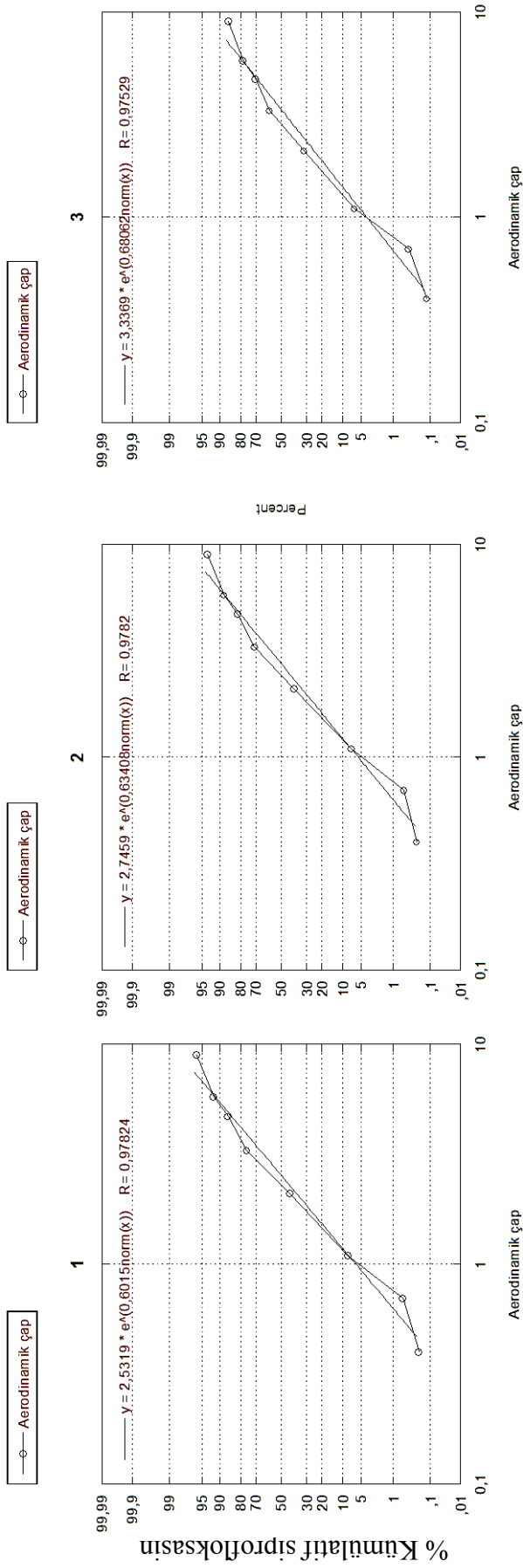
Tablo 4.29. Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı.

Formülasyon	İnhaler aygıtını terk eden toz miktarı (mg)			
	1. puf	2. puf	3. puf*	Toplam
1	21,10	2,30	-	23,40
2	20,60	1,90	-	22,50
3	25,50	1,30	-	26,80
Ortalama±SS	22,40±2,70	1,83±0,50	-	24,23±2,27

*Toplam ağırlıkta herhangi bir değişiklik olmamıştır.

Tablo 4.30. Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan siprofloksasin miktarları (mg).

	Uygulama (% olarak)			Ortalama ± SS	Uygulama (mg olarak)			Ortalama ± SS
	1	2	3		1	2	3	
Filtre	Tutulma (%)	Tutulma (%)	Tutulma (%)		Tutulma (mg)	Tutulma (mg)	Tutulma (mg)	
	0,130	0,128	0,078	0,112±0,029	0,031	0,031	0,019	0,027±0,007
Düze 6	0,214	0,155	0,179	0,182±0,030	0,052	0,038	0,044	0,044±0,007
Düze 5	4,517	3,538	3,784	3,947±0,509	1,096	0,858	0,933	0,963±0,122
Düze 4	19,944	16,722	15,912	17,526±2,133	4,840	4,056	3,924	4,273±0,495
Düze 3	19,447	16,290	17,107	17,615±1,639	4,720	3,951	4,219	4,296±0,390
Düze 2	5,953	5,536	6,688	6,059±0,583	1,445	1,343	1,649	1,479±0,156
Düze 1	3,141	3,419	5,103	3,887±1,062	0,762	0,829	1,258	0,950±0,269
Düze -0	2,331	2,753	4,926	3,336±1,392	0,566	0,668	1,215	0,816±0,349
Düze -1	2,310	3,259	8,415	4,661±3,285	0,561	0,791	2,075	1,142±0,816
Boğaz	2,671	4,779	5,137	4,196±1,332	0,648	1,159	1,267	1,025±0,330
Aygıt	39,341	43,422	32,671	38,478±5,427	9,548	10,532	8,057	9,379±1,246



Şekil 4.87. Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif siprofloksasin değerleri (n=3).

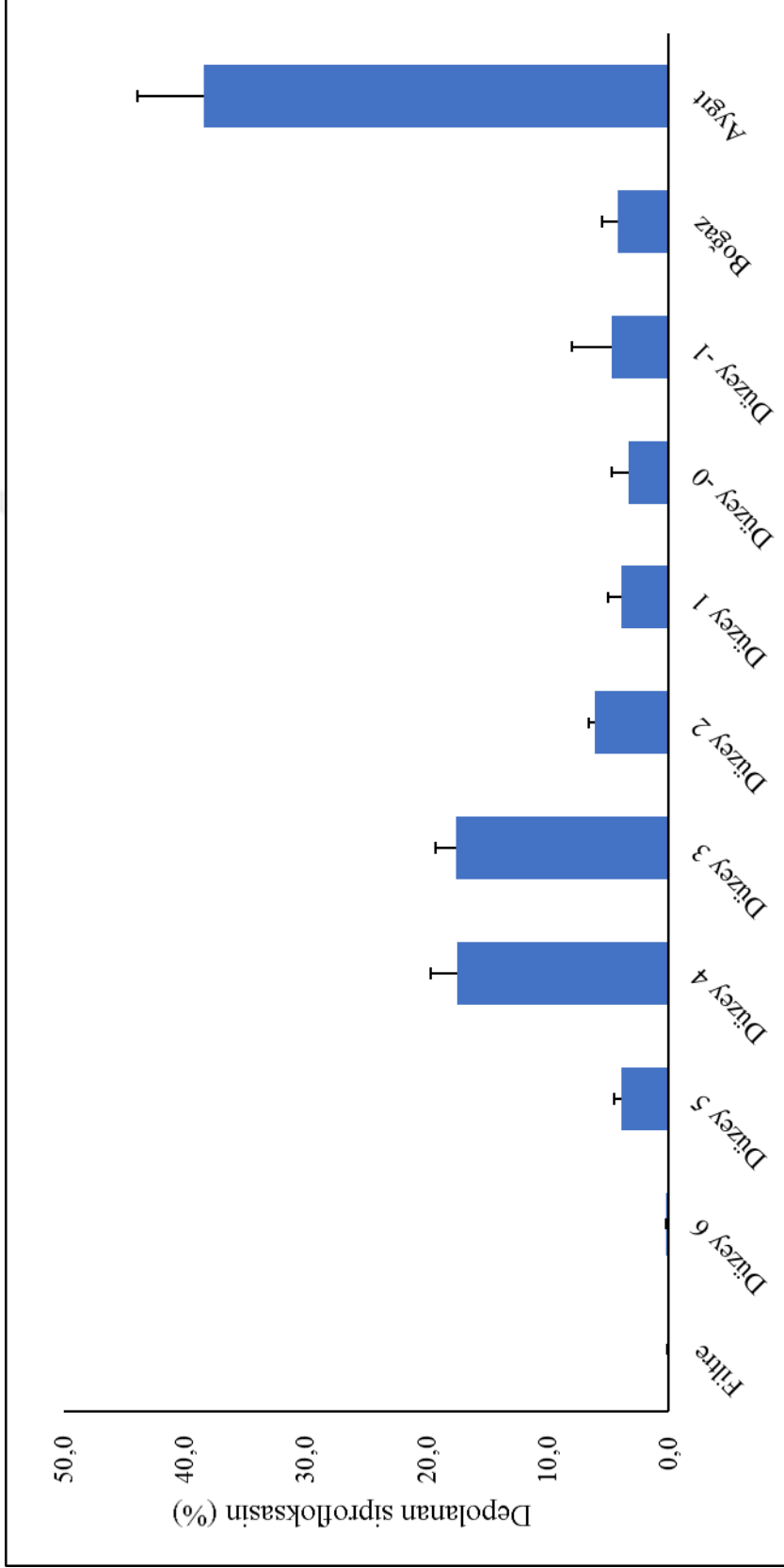
Tablo 4.31. Siprofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları.

	Yüklenen doz	Emitted doz*	Emitted**	KOAÇ***	İnce partikül dozu < 5µm	İnce partikül fraksiyonu < 5µm
Uygulama	(mg)	(mg)	(%)	(µm)	(mg)	(%)
1	26,427	14,722	55,707	2,532	12,257	83,260
2	26,570	13,723	51,647	2,746	10,398	75,773
3	26,570	16,604	62,491	3,337	11,099	66,848
Ortalama ±SS	26,522 ±0,083	15,016 ±1,463	56,615 ±5,479	2,872 ±0,417	11,252 ±0,939	75,294 ±8,217

*İnhaler aygıtını terk eden siprofloksasin baz miktarı

**İnhaler aygıtını terk eden yüzde siprofloksasin miktarı

***Kütle ortalama aerodinamik çap



Şekil 4.88. Siprofloksasin ve domuz alfa içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen siprofloksasin yüzdesi (ortalama \pm SS, n=3).

ACI kullanılarak, levofloksasin içeren KTİ formülasyonundan elde edilen parametreler Tablo 4.32.-Tablo 4.34. ve Şekil 4.89.-Şekil 4.90.'da verilmiştir.

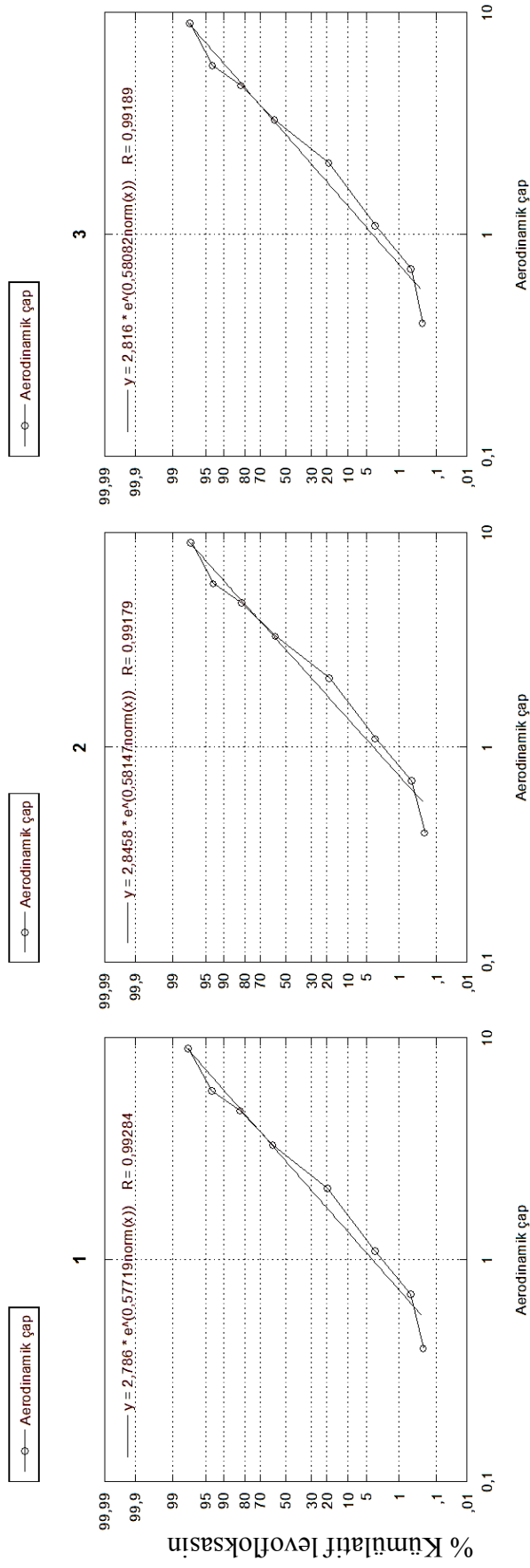
Tablo 4.32. Levofloksasin içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı.

Formülasyon	İnhaler aygıtını terk eden toz miktarı (mg)			
	1. puf	2. puf	3. puf	Toplam
1	16,60	0,10	0,70	17,40
2	24,00	0,45	-*	24,45
3	20,45	0,35	-*	20,80
Ortalama±SS	20,35±3,70	0,30±0,18	-*	20,93±3,53

*Toplam ağırlıkta herhangi bir değişiklik olmamıştır.

Tablo 4.33. Sadece levofloksasin içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan levofloksasin miktarları (mg).

	Uygulama (% olarak)			Ortalama ± SS	Uygulama (mg olarak)			Ortalama ± SS
	1	2	3		1	2	3	
	Tutulan (%)	Tutulan (%)	Tutulan (%)		Tutulan (mg)	Tutulan (mg)	Tutulan (mg)	
Filtre	0,137	0,137	0,148	0,141±0,006	0,037	0,037	0,040	0,038±0,002
Düzey 6	0,152	0,169	0,148	0,156±0,011	0,041	0,046	0,040	0,042±0,003
Düzey 5	1,596	1,752	1,665	1,671±0,078	0,428	0,475	0,450	0,451±0,023
Düzey 4	9,149	9,568	9,252	9,323±0,219	2,455	2,592	2,500	2,516±0,070
Düzey 3	23,164	24,949	24,093	24,069±0,893	6,215	6,759	6,510	6,495±0,272
Düzey 2	12,699	14,635	13,731	13,688±0,969	3,407	3,965	3,710	3,694±0,279
Düzey 1	6,095	7,162	6,588	6,615±0,534	1,635	1,940	1,780	1,785±0,153
Düzey -0	2,373	2,673	2,480	2,509±0,152	0,637	0,724	0,670	0,677±0,044
Düzey -1	1,278	1,628	1,480	1,462±0,176	0,343	0,441	0,400	0,395±0,049
Boğaz	4,105	3,588	3,923	3,872±0,262	1,101	0,972	1,060	1,044±0,066
Aygit	39,253	33,739	36,491	36,494±2,757	10,532	9,141	9,860	9,844±0,696



Şekil 4.89. Sadece levofloksasin içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif levofloksasin değerleri (n=3).

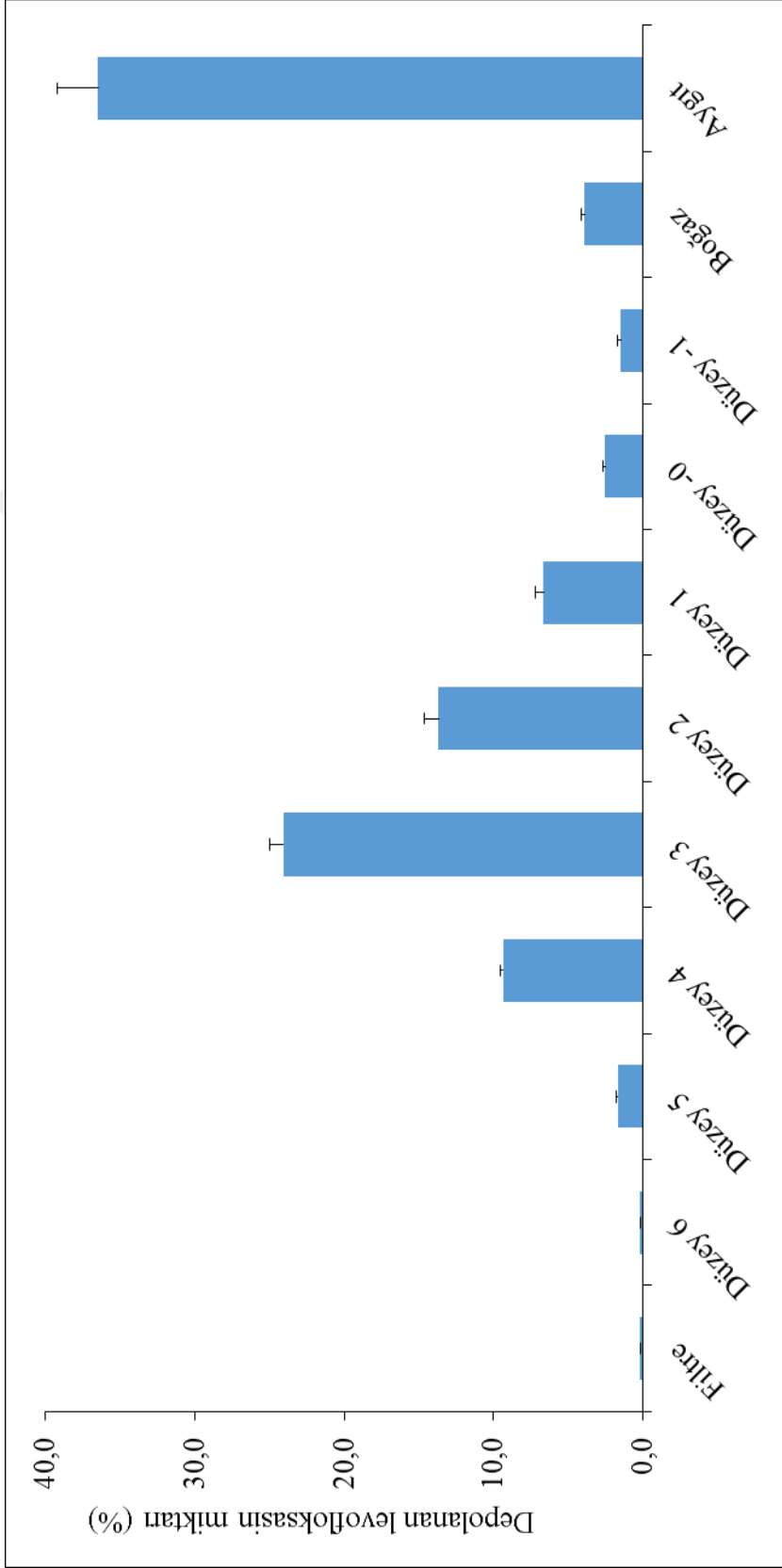
Tablo 4.34. Sadece levofloksasin içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları.

	Yüklenen doz	<i>Emitted</i> doz*	<i>Emitted</i>**	KOAÇ***	İnce partikül dozu < 5µm	İnce partikül fraksiyonu < 5µm
Uygulama	(mg)	(mg)	(%)	(µm)	(mg)	(%)
1	27,412	16,300	59,461	2,786	12,834	78,737
2	27,626	17,952	64,980	2,846	14,156	78,857
3	27,530	17,160	62,230	2,816	14,377	83,784
Ortalama ±SS	27,523 ±0,107	17,137 ±0,826	62,224 ±2,759	2,816 ±0,030	13,789 ±0,835	80,459 ±2,880

*İnhaler aygıtını terk eden levofloksasin baz miktarı

**İnhaler aygıtını terk eden yüzde levofloksasin miktarı

***Kütle ortalama aerodinamik çap



Şekil 4.90. Sadece levofloksasin içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen levofloksasin yüzdesi (ortalama \pm SS, n=3).

ACI kullanılarak, levofloksasin ve asetilsistein içeren KTİ formülasyonundan elde edilen parametreler Tablo 4.35.-Tablo 4.37. ve Şekil 4.91.-Şekil 4.92.'de verilmiştir.

Tablo 4.35. Levofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı.

Formülasyon	İnhaler aygıtını terk eden toz miktarı (mg)			
	1. puf	2. puf	3. puf	Toplam
1	19,60	0,90	0,70	21,20
2	27,90	1,40	0,40	29,70
3	23,76	1,14	0,54	25,44
Ortalama±SS	23,75±4,15	1,15±0,25	0,55±0,15	25,45±4,25

Tablo 4.36. Levofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan levofloksasin miktarları (mg).

	Uygulama (% olarak)			Ortalama ± SS	Uygulama (mg olarak)			Ortalama ± SS
	1	2	3		1	2	3	
	Tutulan (%)	Tutulan (%)	Tutulan (%)		Tutulan (mg)	Tutulan (mg)	Tutulan (mg)	
Filtre	1,102	0,870	0,620	0,864±0,241	0,334	0,270	0,197	0,267±0,068
Düzey 6	0,181	0,120	0,132	0,144±0,032	0,055	0,060	0,042	0,052±0,009
Düzey 5	2,248	2,093	1,872	2,071±0,189	0,681	0,650	0,596	0,642±0,043
Düzey 4	17,005	15,169	13,366	15,180±1,820	5,149	4,710	4,253	4,704±0,448
Düzey 3	21,334	20,934	20,499	20,922±0,418	6,460	6,500	6,523	6,494±0,032
Düzey 2	6,577	7,923	9,273	7,924±1,348	1,992	2,460	2,951	2,467±0,480
Düzey 1	2,320	3,092	3,870	3,094±0,775	0,703	0,960	1,232	0,965±0,265
Düzey -0	1,137	1,514	1,851	1,501±0,357	0,344	0,470	0,589	0,468±0,122
Düzey -1	0,869	1,031	1,259	1,053±0,196	0,263	0,320	0,401	0,328±0,069
Boğaz	2,389	2,544	2,670	2,534±0,141	0,723	0,790	0,850	0,788±0,063
Aygit	44,838	44,638	44,588	44,688±0,132	13,577	13,860	14,189	13,875±0,306

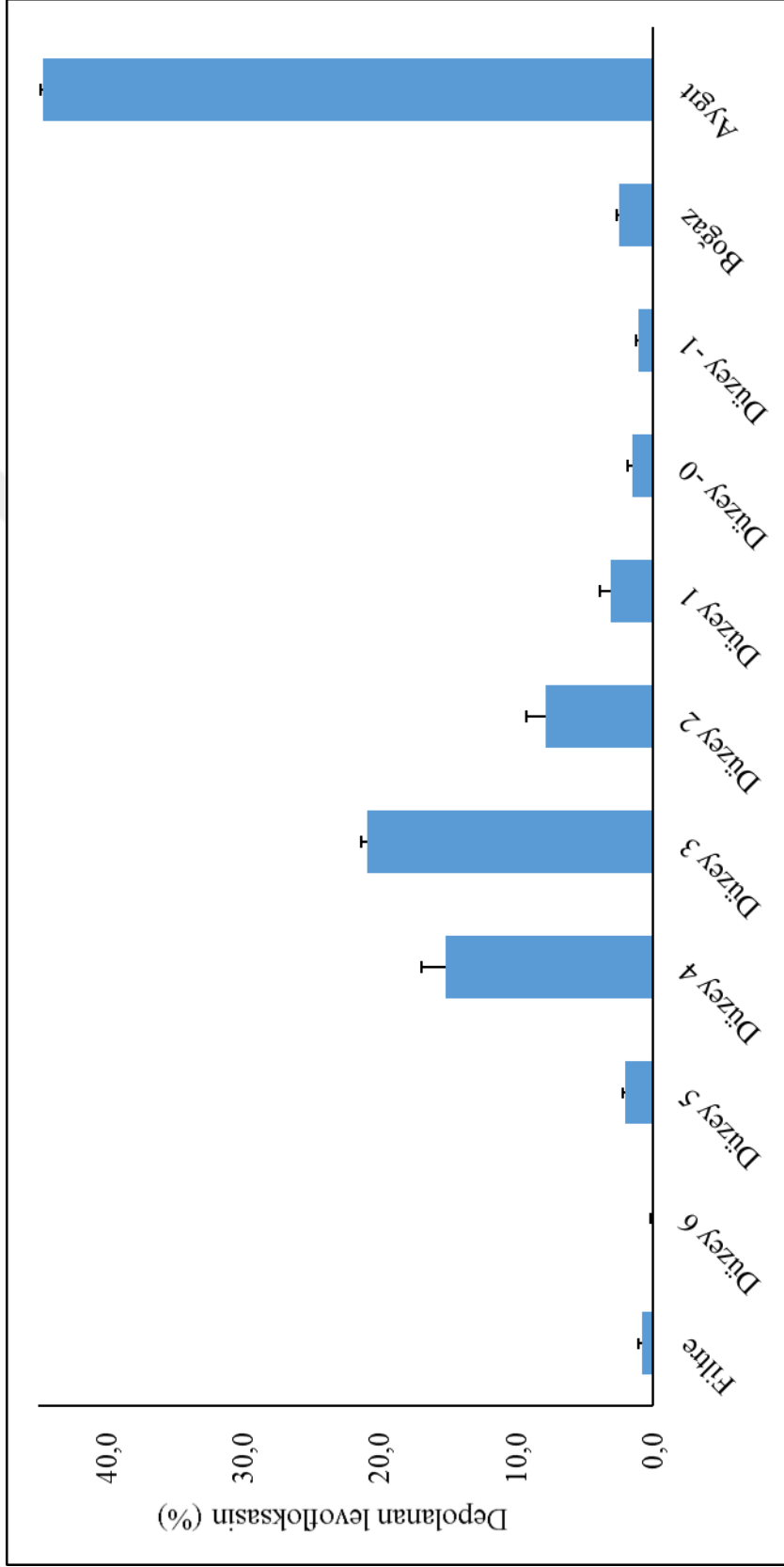
Tablo 4.37. Levofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları.

	Yüklenen doz	Emitted doz*	Emitted**	KOAC***	İnce partikül dozu < 5µm	İnce partikül fraksiyonu < 5µm
Uygulama	(mg)	(mg)	(%)	(µm)	(mg)	(%)
1	27,512	16,704	60,713	2,132	14,603	87,423
2	27,720	17,190	62,234	2,277	14,923	86,812
3	27,910	17,634	63,180	2,452	14,626	82,941
Ortalama ±SS	27,714 ±0,199	17,176 ±0,465	62,042 ±1,245	2,287 ±0,160	14,717 ±0,179	85,726 ±2,431

*İnhaler aygıtını terk eden levofloksasin baz miktarı

**İnhaler aygıtını terk eden yüzde levofloksasin miktarı

***Kütle ortalama aerodinamik çap



Şekil 4.92. Levofloksasin ve asetilsistein içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen levofloksasin yüzdesi (ortalama \pm SS, n=3).

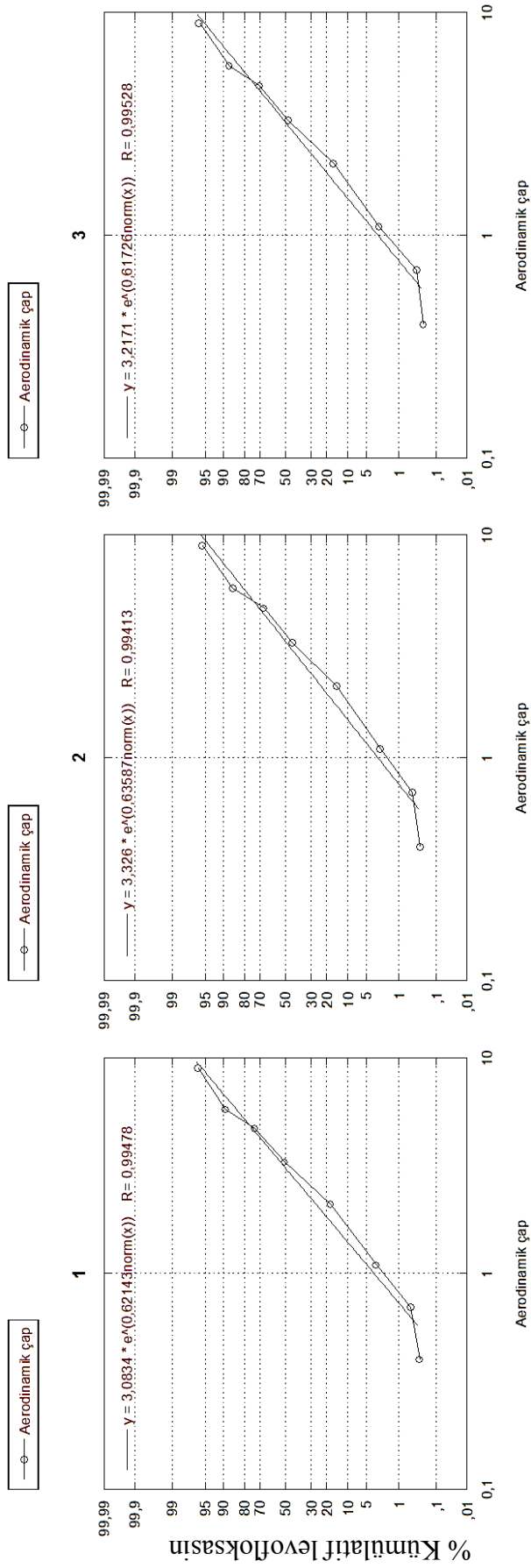
ACI kullanılarak, levofloksasin ve dornaz alfa içeren KTİ formülasyonundan elde edilen parametreler Tablo 4.38.-Tablo 4.40. ve Şekil 4.93.-Şekil 4.94.'te verilmiştir.

Tablo 4.38. Levofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyona ait her bir uygulamadan sonra inhaler aygıtını terk eden toz miktarı.

Formülasyon	İnhaler aygıtını terk eden toz miktarı (mg)			
	1. puf	2. puf	3. puf	Toplam
1	28,60	0,40	0,50	29,50
2	28,40	0,60	0,30	29,30
3	28,51	0,49	0,39	29,39
Ortalama±SS	28,50±0,10	0,50±0,10	0,40±0,10	29,40±0,10

Tablo 4.39. Levofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyonların ACI cihazının her bir aşamasında tutulma yüzdeleri ve tutulan levofloksasin miktarları (mg).

	Uygulama (% olarak)			Ortalama ± SS	Uygulama (mg olarak)			Ortalama ± SS
	1	2	3		Tutulan (%)	Tutulan (mg)	Tutulan (mg)	
Filtre	0,190	0,174	0,149	0,171±0,021	0,051	0,047	0,040	0,046±0,006
Düzey 6	0,129	0,105	0,075	0,103±0,027	0,035	0,028	0,020	0,028±0,007
Düzey 5	1,655	1,288	1,494	1,479±0,184	0,444	0,347	0,400	0,397±0,048
Düzey 4	9,150	7,378	8,252	8,260±0,886	2,455	1,989	2,210	2,218±0,233
Düzey 3	20,550	17,963	19,305	19,273±1,294	5,514	4,842	5,170	5,175±0,336
Düzey 2	14,245	13,822	14,003	14,023±0,212	3,822	3,726	3,750	3,766±0,050
Düzey 1	9,796	11,349	10,530	10,558±0,777	2,628	3,059	2,820	2,836±0,216
Düzey -0	4,427	5,984	5,190	5,200±0,779	1,188	1,613	1,390	1,397±0,213
Düzey -1	2,295	2,636	2,390	2,440±0,176	0,616	0,711	0,640	0,655±0,049
Boğaz	8,630	10,560	9,597	9,595±0,965	2,315	2,847	2,570	2,577±0,266
Aygit	28,933	28,742	29,014	28,896±0,140	7,762	7,748	7,770	7,760±0,011



Şekil 4.93. Levofloksasin dornaz alfa içeren formülasyonlara ait aerodinamik çap değerlerinin fonksiyonu olarak % kümülatif levofloksasin değerleri (n=3).

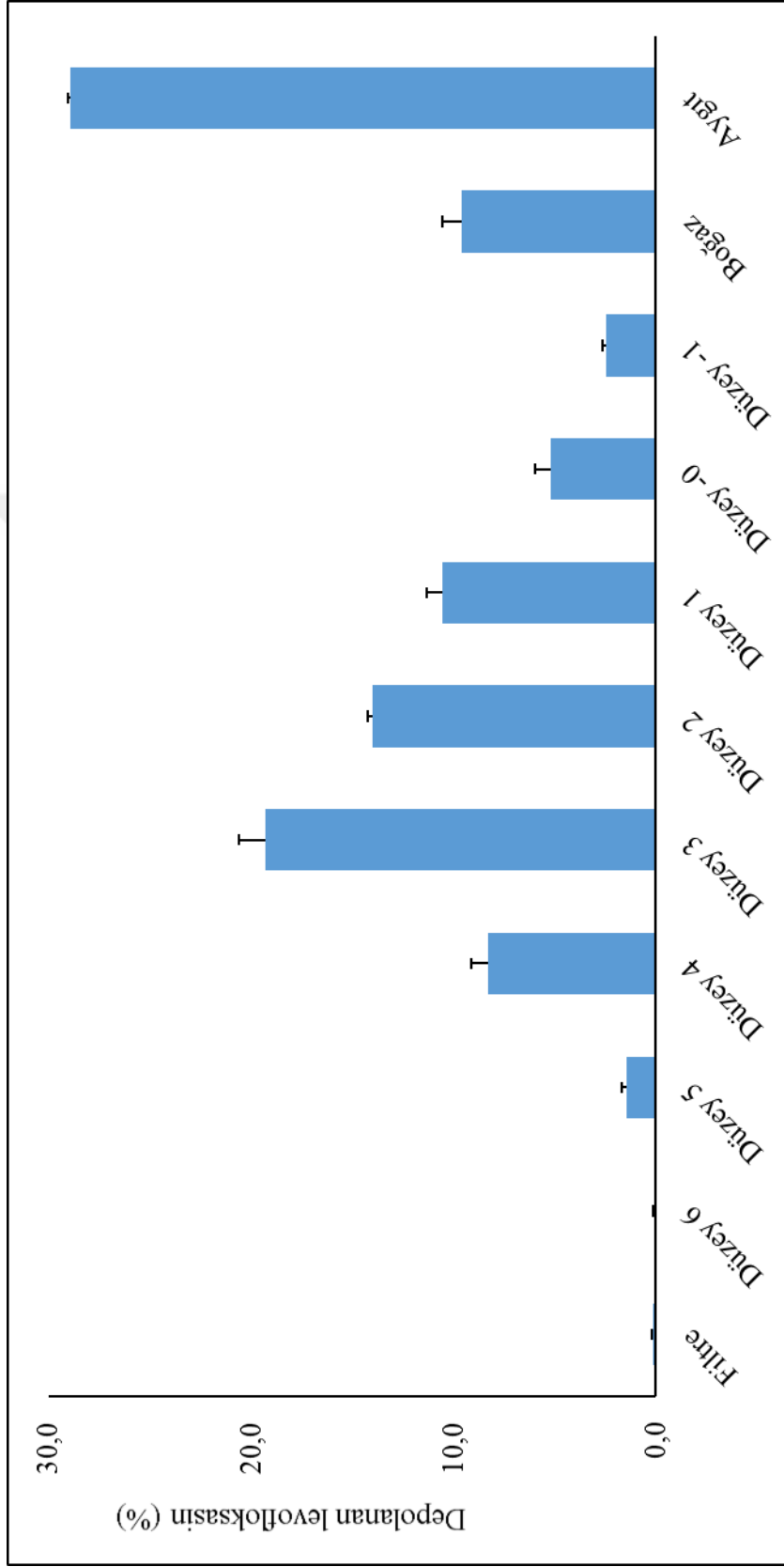
Tablo 4.40. Levofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyona ait ACI deneyi bulguları.

	Yüklenen doz	Emitted doz*	Emitted**	KOAÇ***	İnce partikül dozu < 5µm	İnce partikül fraksiyonu < 5µm
Uygulama	(mg)	(mg)	(%)	(µm)	(mg)	(%)
1	27,712	19,067	68,803	3,083	13,093	68,668
2	27,617	19,209	69,556	3,326	12,095	62,963
3	27,650	19,010	68,727	3,217	12,609	66,331
Ortalama ± SS	27,660 ±0,048	19,095 ±0,103	69,029 ±0,458	3,209 ±0,122	12,599 ±0,499	65,987 ±2,868

*İnhaler aygıtını terk eden levofloksasin baz miktarı

**İnhaler aygıtını terk eden yüzde levofloksasin miktarı

***Kütle ortalama aerodinamik çap



Şekil 4.94. Levofloksasin ve dornaz alfa içeren formülasyon ile ACI cihazının her bir aşamasından elde edilen levofloksasin yüzdesi (ortalama \pm SS, n=3).

4.9. Etkin Madde ve Formülasyonlara İlişkin Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışmaları

4.9.1. MTT Yöntemi İle İn Vitro Hücre Canlılığının İncelenmesi

MTT yöntemiyle formülasyonların hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. 100 µg/mL ve 500 µg/mL derişimde antibiyotik içeren formülasyonların 24 saat süresince yapılan canlılık çalışması sonuçları Tablo 4.41.'de verilmiştir.

Tablo 4.41. 100 ve 500 µg/mL derişimde antibiyotik içeren formülasyonların hücre canlılık deneyi sonuçları.

	100 µg/mL					
	C	CA	CD	L	LA	LD
Ortalama	0,459	0,403	0,384	0,424	0,449	0,382
% Canlılık	117,179	102,808	98,069	108,126	114,694	97,558
	500 µg/mL					
	C	CA	CD	L	LA	LD
Ortalama	0,421	0,393	0,370	0,345	0,375	0,286
% Canlılık	107,351	100,255	94,325	88,097	95,814	72,901

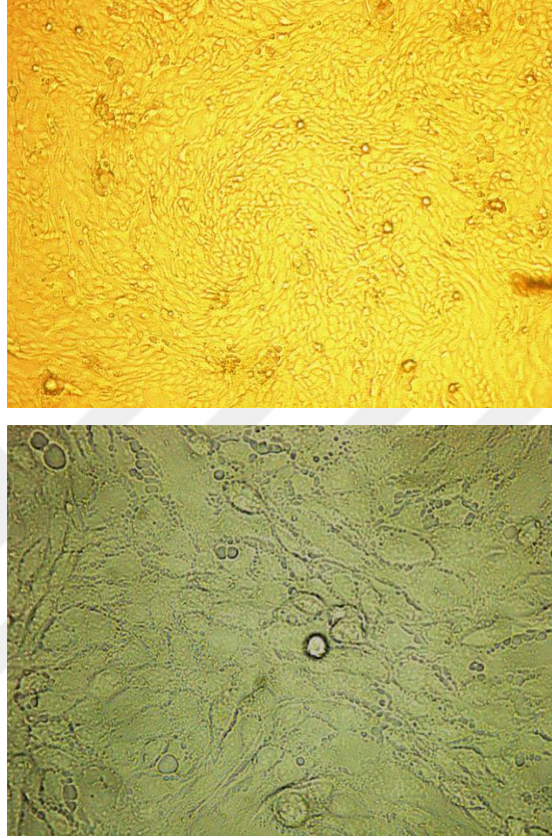
(C: Siprofloksasin KTİ, CA: Siprofloksasin-Asetilsistein KTİ, CD: Siprofloksasin-Dornaz alfa KTİ, L: Levofloksasin KTİ, LA: Levofloksasin-Asetilsistein KTİ, LD: Levofloksasin-Dornaz alfa KTİ)

4.9.2. Calu-3 Hücrelerinin Bütünlüğünün TEER (Transepitel Elektriksel Rezistans) Ölçümü ile Değerlendirilmesi

Plakalara ekilen hücrelerin TEER değerleri permeabilite çalışmalarından hemen önce ve hemen sonra ölçülmüştür. Böylece permeabilite çalışmalarına başlamadan hücre tek tabakalarının oluştuğu ve bu tek tabaka formunun geçiş çalışması boyunca devam ettiği gözlenmiştir. Literatürde hava arayüzeyinde çoğaltılan Calu-3 hücrelerinin TEER değerinin 300 Ω.cm² den büyük olduğu belirtilmiş (196, 247), çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlar da literatür bilgisi ile uyumlu biçimde ~400-450 Ω.cm² olarak bulunmuştur. Literatürde, sıvı arayüzeyinde çoğaltılan Calu-3 hücrelerinin TEER değerinin ~1000 Ω.cm² olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda da TEER değeri, literatür bilgisiyle uyumlu biçimde ~1000 Ω.cm² olarak bulunmuştur.

4.9.3. Calu-3 Hücrelerinin *Inverted* Mikroskop ile Görüntülenmesi

Kültür ortamındaki hücrelerin fotoğrafı *inverted* mikroskop kullanılarak çekilmiştir (Şekil 4.95.).



Şekil 4.95. Calu-3 hücre hattının *inverted* mikroskop ile görüntülenmesi (x10 ve x40).

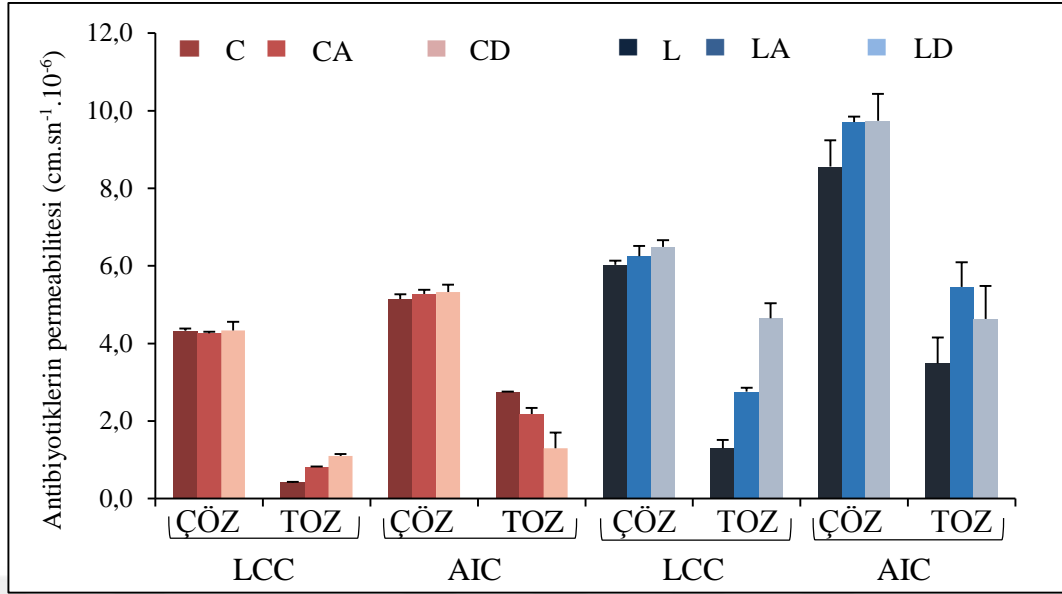
4.9.4. Geçiş Çalışmaları

Uygun TEER değerlerine ulaşan, sıvı arayüzeyinde ve hava arayüzeyinde 12 kuyucuklu plakalarda çoğaltılan Calu-3 hücrelerine, çözelti (sıvı) ve kuru toz olarak formülasyonlar ve fiziksel karışımlar uygulanmış; 2. saatin sonunda bazolateralardan alınan 500 μ L örnek, geliştirilen HPLC yöntemi ile ölçülmüş; siprofloksasin ve levofloksasinin % geçen miktarları ve permeabilite değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.42., Şekil 4.96.-Şekil 4.97.).

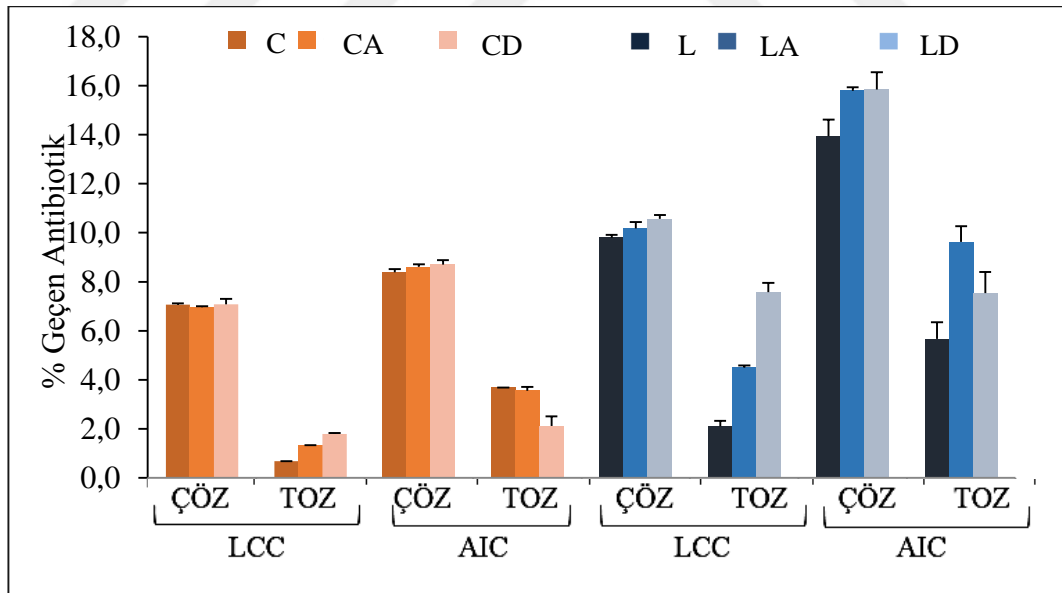
Tablo 4.42. Siprofloksasin ve levofloksasinin formülasyon ve fiziksel karışımlarından geçirilme hızları ve % geçen miktarları.

			Permeabilite (cm/sn).10⁻⁶	Geçen Miktar (%)
SIVI ARAYÜZEYİ	Çözelti olarak uygulanan formülasyonlar	C	4,328±0,057	7,066±0,093
		CA	4,264±0,038	6,961±0,063
		CD	4,337±0,223	7,079±0,364
		L	6,024±0,110	9,803±0,179
		LA	6,250±0,266	10,171±0,433
		LD	6,492±0,167	10,563±0,272
	Katı olarak uygulanan formülasyonlar	C	0,421±0,006	0,685±0,010
		CA	0,815±0,016	1,327±0,026
		CD	1,103±0,043	1,795±0,070
		L	1,295±0,215	2,109±0,350
		LA	2,759±0,099	4,493±0,162
		LD	4,650±0,384	7,573±0,625
HAVA ARAYÜZEYİ	Çözelti olarak uygulanan formülasyonlar	C	5,141±0,125	8,393±0,205
		CA	5,275±0,108	8,611±0,176
		CD	5,328±0,184	8,698±0,300
		L	8,565±0,676	13,938±1,100
		LA	9,707±0,141	15,795±0,230
		LD	9,739±0,698	15,848±1,136
	Katı olarak uygulanan formülasyonlar	C	2,758±0,000	3,692±1,380
		CA	2,184±0,153	3,554±0,249
		CD	1,300±0,400	2,115±0,651
		L	3,482±0,673	5,671±1,097
		LA	5,461±0,636	9,626±1,177
		LD	4,629±0,856	7,538±1,394
	Katı olarak uygulanan fiziksel karışımlar	Fiziksel C	0,329±0,046	0,535±0,075
		Fiziksel CA	1,452±0,534	2,363±0,868
		Fiziksel L	4,281±1,659	6,972±2,702
Fiziksel LA		4,310±1,174	7,020±1,912	

(C: Siprofloksasin KTİ, CA: Siprofloksasin-Asetilsistein KTİ, CD: Siprofloksasin-Dornaz alfa KTİ, L: Levofloksasin KTİ, LA: Levofloksasin-Asetilsistein KTİ, LD: Levofloksasin-Dornaz alfa KTİ)



Şekil 4.96. Siprofloksasin ve levofloksasin içeren KTİ formülasyonlarından antibiyotiklerin permeabilitesi (ortalama±SS; n=3) (ÇÖZ: çözelti, TOZ: toz, LCC: sıvı kaplı kültür, AIC: hava arayüzeyinde kültür) (C: Siprofloksasin KTİ, CA: Siprofloksasin-Asetilsistein KTİ, CD: Siprofloksasin-Dornaz alfa KTİ, L: Levofloksasin KTİ, LA: Levofloksasin-Asetilsistein KTİ, LD: Levofloksasin-Dornaz alfa KTİ).



Şekil 4.97. Siprofloksasin ve levofloksasin içeren KTİ formülasyonlarından antibiyotiklerin yüzde geçen miktarı (ortalama±SS; n=3) (ÇÖZ: çözelti, TOZ: toz, LCC: sıvı kaplı kültür, AIC: hava arayüzeyinde kültür) (C: Siprofloksasin KTİ, CA: Siprofloksasin-Asetilsistein KTİ, CD: siprofloksasin-Dornaz alfa KTİ, L: Levofloksasin KTİ, LA: Levofloksasin-Asetilsistein KTİ, LD: Levofloksasin-Dornaz alfa KTİ).

5. TARTIŞMA

Bu bölümde tez çalışması kapsamında kullanılan siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein, dornaz alfa etkin maddelerinin fizikokimyasal özellikleri, analitik yöntem validasyonu, çözünürlük çalışmaları, KTI formülasyonlarının hazırlanması, elde edilen formülasyonların in vitro karakterizasyonu, aerodinamik parametrelerinin hesaplanması ile formülasyonlar ve fiziksel karışımların permeabilite bulguları değerlendirilmiştir.

5.1. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Asetilsistein Maddelerinin Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, geliştirilen analiz yönteminin özelliklerinin istenilen amaçlara uygun olduğunu göstermek için yapılan işlemler bütünü olarak tanımlanmaktadır (Bkz. Şekil 4.29.-Şekil 4.46., Tablo 4.3.-Tablo 4.14.)

Yapılan miktar tayinleri sonucunda, tanımlayıcılık katsayıları siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein için $R^2=0,9999$ olarak bulunmuştur ve bu değer de yöntemlerin doğrusallığını göstermektedir. Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin alıkonma zamanları sırasıyla 13,516 dk., 10,253 dk. (Bkz. Şekil 4.38.), 4,022 dk. (Bkz. Şekil 4.39.) olarak bulunmuştur. Validasyon parametrelerinden doğruluk, tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik, dayanıklılık çalışmaları yapılmış, elde edilen sonuçların varyasyon katsayıları %2'den küçük bulunmuştur. Bu sonuç, siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein için yöntemlerin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin teşhis sınırları sırasıyla 13,807 µg/mL, 2,139 µg/mL, 7,421 µg/mL, tayin sınırları ise sırasıyla 41,840 µg/mL, 6,481 µg/mL, 22,488 µg/mL olarak bulunmuştur. HPLC yöntemimizin çalışmalarımız için özgün olduğu saptanmıştır.

Yapılan BCA analizi sonucunda dornaz alfa için tanımlayıcılık katsayısı $R^2=0,9837$ olarak bulunmuştur, bu da yöntemlerin doğrusallığını göstermektedir (Bkz. Şekil 4.47.). Aynı koşullar altında BCA yöntemi ile analiz edilen siprofloksasin ve levofloksasin maddelerinin absorbans vermemesi de yöntemin özgüllüğünü göstermektedir.

5.2. Formülasyon Çalışmaları

5.2.1. Formülasyon Hazırlamada Kullanılan Yöntemlerin Değerlendirilmesi

Kistik fibrozis hastalarında, akciğerde enfeksiyona neden olan bakterilere karşı inhaler olarak kullanılan antibiyotiklerin MİD'e ulaşabilmeleri için gereken doz oldukça yüksek olduğundan, uygulanacak hacmi daha da arttırmamak amacıyla formülasyonlarda taşıyıcı kullanılmamıştır. Taşıyıcı kullanılmaması, aerodinamik özellikleri istenen düzeylere çıkarmak hususunda önemli bir engeldir. Bu engeli aşmak için KTİ formülasyonlarının üretiminde, partikül mühendisliğinde sıkça kullanılan bilyalı değirmen, yüksek basınçlı homojenizasyon ve püskürterek kurutma yöntemleri tercih edilmiş ve yöntem parametreleri istenen sonuçlara göre optimize edilmiştir.

Bilyalı değirmen yönteminde, bilya sayıları ve büyüklükleri, bilya ağırlığı:süspansiyon hacmi oranı, süspansiyon katı içeriği, dönüş hızı, öğütme süresi gibi parametreler değiştirilerek, yöntem optimize edilebilmektedir. Süspansiyon katı içeriği azaldıkça, dönüş hızı ve öğütme süresi arttıkça, partikül boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.74.).

Partikül büyüklüğü dağılımını küçültmek için kullandığımız aygıtlardan diğeri de homojenizatördür. Homojenizatörün *chamber* çapı 100 µm olduğu için, sistemde bir tıkanıklığa neden olmamak amacıyla, homojenizatör aşamasından önce bir ön öğütme işlemine gerek duyulmuş, bu amaçla bilyalı değirmen yöntemi tercih edilmiştir. Bu aşamada 25 µm'den küçük partiküller elde etmek yeterli olduğundan, bilyalı değirmen parametreleri amacımız doğrultusunda modifiye edilmiş ve ön çalışmalar sonucunda uygun değerler seçilmiştir (16 adet 20 mm çapında agat bilya kullanılarak 100 rpm'de 60 dk.). Bilyalı değirmen yöntemi, birçok maddenin öğütülmesi amacıyla kullanılabilmeyle birlikte, özellikle işlem sırasındaki sürtünmeden veya ortaya çıkabilecek ısıdan kaynaklanan stabilite sorunlarına neden olabilmektedir. Çalışmamızda böyle bir sorun ile karşılaşmamak için, 25 µm'den küçük partikül boyutu ve homojen bir süspansiyon elde etmeyi sağlayan minimum dönüş hızı ve öğütme süresi seçilmiştir. Ön formülasyon çalışmaları ile elde edilen süspansiyonların antibiyotik içerikleri ve organoleptik özellikleri kontrol edilmiştir.

Bu nedenle, partikül boyutunu inhale edilebilir düzeye getirme hedefi, yüksek basınçlı homojenizasyon aşamasına bırakılmıştır.

Homojenizasyon yönteminde, süspansiyonun katı içeriği, sistemden geçirilme sayısı ve basınç gibi parametreler değiştirilerek, yöntem optimize edilmiştir. Süspansiyonun katı içeriği azaldıkça, basınç ve süspansiyonun sistemden geçirilme sayısı arttıkça partikül boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.75.). Bu aşamada, siprofloksasin içeren formülasyonların üretimi için 2 µm'den küçük partiküllerin elde edilmesi amaçlanmış ve işlem parametreleri amaca uygun olarak seçilmiştir. Süspansiyonların püskürtülerek kurutulması ile partikül büyüklüğünün küçülmesi mümkün değildir. Çünkü teorik olarak hedeflenen, süspansiyonun püskürtülmesi ile her bir partikülün bir damlacıkta tutulması ve kurutma işlemi ile bu partikülün büyüklüğünü koruyarak kuru toz olmasıdır. Fakat işlem sırasında partiküllerin agrege olmasıyla süspansiyondan daha büyük partikül boyutuna sahip tozlar elde edilebilmektedir. Bu nedenle homojenizasyon yöntemi ile hedeflenen partikül boyutu, inhale edilebilir aralığın (1-5 µm) alt sınırında seçilmiştir. Böylece, agregasyon gerçekleşse bile, partikül büyüklüğünün inhale edilebilir aralıkta kalması sağlanmıştır.

Levofloksasinin izopropil alkolde çözünürlüğü çok düşük olduğundan ve düşük derişimlerde bile manyetik karıştırıcı ile karıştırarak berrak bir çözelti elde edilemediğinden, levofloksasin çözeltisi elde etmek amacıyla homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. Sistemi daha da seyreltmek, püskürterek kurutma süresini çok artıracığı ve sonuçta elde edilen partikül boyutunda da iyileşme olmayacağı için tercih edilmemiştir. Homojenizasyon yöntemi ile oldukça kısa sürede, berrak çözelti elde edilmiştir. Siprofloksasin içeren formülasyonlarda kullanılan yöntemlerin levofloksasin içeren formülasyonlar için de kullanılması, elde edilen sonuçların karşılaştırılabilirliğini artırmıştır.

Yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminde uygulanan basınç, işlem sırasında yüksek miktarda ısı açığa çıkarmaktadır. Stabilite sorununu engellemek için sistem dışarıdan soğutulmuş ve sistemden çıkan karışımların sıcaklığı kontrol edilerek, ısıdan kaynaklı stabilite sorunu riski ortadan kaldırılmıştır.

Püskürterek kurutma yönteminde; süspansiyon veya çözelti derişimi, organik çözelti derişimi, pompa hızı, giriş sıcaklığı, gaz akış hızı parametreleri değiştirilerek yöntem optimize edilebilmektedir. Derişim ve pompa hızı azaldıkça, gaz akış hızı ve organik çözücü derişimi arttıkça partikül boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir. Tez kapsamında, püskürterek kurutma yöntemi ile yaklaşık 2 µm çapında partikül büyüklüğü elde etmek amaçlanmış ve amaca uygun olarak yöntem parametreleri optimize edilmiştir. Siprofloksasin içeren formülasyonlar, süspansiyondan hareketle hazırlandığı için agregasyon olasılığını düşük tutmak amacıyla süspansiyonun katı içeriği oldukça düşük tutulmuştur. Levofloksasin içeren formülasyonların üretiminde, inhale edilebilir partikül büyüklüğü elde etmek amacıyla oldukça düşük derişimlerde çalışılmıştır. Tüm bu yaklaşımlar sonucunda, inhale edilebilir boyutta formülasyonlar elde edilebilmiştir.

5.3. Fizikokimyasal Analizler

Tez çalışması kapsamında, dornaz alfa kaynağı olarak Pulmozyme® piyasa preparatı kullanılmıştır. Bu preparat çözelti formunda olduğu için, UV spektrumu dışında fizikokimyasal analizler yapılamamıştır.

5.3.1. UV Spektrumu

Formülasyonlar hazırlanmadan önce, etkin maddelerin UV spektrumları çekilmiş, siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ve dornaz alfa (Pulmozyme®) için maksimum absorbans değerleri sırasıyla 276,6, 287,4, 191,4 ve 192 nm şeklinde bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.1.-Şekil 4.4.). Siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein için bu değerler literatür ile uyumludur (261-263). Maddelerin, maksimum absorbans verdikleri dalga boylarının literatür ile uyumlu bulunması kullanılan maddelerin spesifikasyon sınırları içerisinde kaldığını göstermektedir.

5.3.2. FT-IR Spektrumu

İşlem görmemiş etkin maddelerin (dornaz alfa hariç) ve üretilen KTI'lerin FT-IR analizleri yapılmış, elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (249-251, 256-258). Formülasyonlar ile yapılan FT-IR analizleri ile etkin maddelere ait piklerin görülmesi, formülasyonlardaki etkin maddelerin özelliklerini koruduğunu göstermektedir.

İşlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ile siprofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımlarına ait FT-IR spektrumları Şekil 4.5.-Şekil 4.9.'da; püskürterek kurutma ile hazırlanmış KTİ formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları Şekil 4.48.-Şekil 4.53.'te verilmiştir. İşlem görmemiş siprofloksasinden ve siprofloksasin içeren formülasyonlardan elde edilen spektrumlarda, siprofloksasine ait tüm karakteristik piklerin mevcut olduğu görülmüştür (2924,05-2930,08 cm^{-1} aromatik grup, 1697,96-1731,37 cm^{-1} CO grubu, 1621,89-1626,63 cm^{-1} kinolinler, 1393,89-1453,98 cm^{-1} karbonil grubu, 1250,07-1266,64 cm^{-1} hidroksil grubu, 1050-1000 cm^{-1} florin grubu) (249). Benzer şekilde işlem görmemiş levofloksasin ve levofloksasin içeren formülasyonlardan da maddeye ait karakteristik pikler elde edilmiştir (3240,02-3238,95 cm^{-1} karboksil grubunun OH gerilimi, 2929,88-2937,73 cm^{-1} aromatik C-G gerilimi, 1620,00-1620,49 cm^{-1} C=C gerilimi) (264).

İşlem görmemiş antibiyotiklerin spektrumları ile karşılaştırıldığında formülasyonlara ait spektrumlarda 3000-3500 cm^{-1} arasındaki kayıp pikler, antibiyotiklerin su içeriğinin inhaler üretim prosesi ile kaybedildiğini veya azaldığını göstermektedir (265). Siprofloksasin-asetilsistein ve levofloksasin-asetilsistein fiziksel karışımlarına ait spektrumların, işlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein spektrumları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu durum da maddelerin bir arada bulunmasının FT-IR sonuçlarında bir değişikliğe sebep olmadığını yani maddelerin birbirleri ile geçimli olduğunu göstermektedir.

FT-IR sonuçları, antibiyotiklerin kimyasal yapısının, üretilen inhalerde de muhafaza edildiğini yani üretim prosesinin veya mukolitik eklenmesinin siprofloksasin veya levofloksasinin moleküler yapıları üzerinde bir etkiye sahip olmadığını, kimyasal stabiliteyi korumak için uygun yaklaşımlar olduklarını göstermiştir.

5.3.3. DSC Analizi

Literatürde siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin erime noktaları, sırasıyla, 311-320°C, 225-227°C, 106-112°C olarak belirtilmiş; çalışmamızda ise işlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteinin erime noktaları

321,24°C, 233,32°C, 112,42°C olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.10.-Şekil 4.12.) (252-255). Formülasyonlar ile yapılan DSC analizi sonuçlarında, etkin maddelere ait erime noktası piklerinin görülmesi formülasyonlardaki etkin maddelerin özelliklerini koruduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 4.54.-Şekil 4.55.).

İşlem görmemiş, kristal yapısındaki siprofloksasinin DSC analizinde, 135-180°C arasında geniş bir endotermik pik görülmektedir; bunun nedeni üretim yöntemi kapsamında kristal suyunun buharlaşmasıdır ve literatürde de verildiği gibi maddenin erimesinden kaynaklı 320°C civarında ikili pik yer almaktadır (266, 267).

İşlem görmemiş levofloksasinin DSC analizi ile termal davranışı incelendiğinde, 80-100°C arasında kristalizasyon suyunun buharlaştığı gözlenmiştir (267). Artan sıcaklık ile birlikte 225°C'de küçük bir endotermik pik, bunu takiben 233°C'de keskin bir pik ve sonrasında da küçük bir ekzotermik pik görülmüştür. Bu termal olaylar sırasıyla kristal şeklin erimesi (225-227°C, literatürde verildiği gibi), takiben tekrar kristallenme ve sonrasında da kristal formun erimesi olarak özetlenebilir (254, 268-270).

Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan siprofloksasin içeren formülasyonların DSC analizi sonuçları, siprofloksasinin tek başına veya mukolitik ajanlar ile püskürtüldüğünde aynı erime noktasının elde edildiğini göstermiştir. Siprofloksasin-asetilsistein içeren inhaler tozu ile 110°C'de, asetilsisteinin erimesini gösteren bir endotermik pik elde edilmiştir ve pikin göreceli olarak küçük olmasının nedeni asetilsistein miktarının siprofloksasine göre çok düşük olmasıdır (271). Siprofloksasin içeren KTİ'ler, kristal şeklindeki siprofloksasinin bilyalı değirmen ile öğütülmesi ve yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilmesi ile elde edilen süspansiyonlarından hazırlanmıştır ve işlem sonunda başlangıç maddesinin kristal şekli muhafaza edilmiştir. XRD analizi sonuçları da bu öngörüye destekler niteliktedir. Bununla birlikte, püskürtülerek kurutulmuş siprofloksasin içeren KTİ'ler ile 100°C civarında herhangi bir pik görülmemiştir; bu durum işlem görmemiş siprofloksasinde bulunan su içeriğinin ve dispersiyon ortamı olarak kullanılan izopropil alkolün üretim işlemi sırasında uzaklaştığını göstermektedir (267).

Püskürterek kurutma ile üretilen levofloksasin içeren KTİ'lerin DSC analizi sonucunda, işlem görmemiş levofloksasin ile aynı noktada erime piki elde edilmiştir. Püskürterek kurutma sonrasında, su içeriğine işaret eden 80-100°C arasındaki endotermik pik, en şiddetli şekilde, sadece levofloksasin içeren KTİ'de görülmüştür. Bu bulgu da, sadece levofloksasin içeren çözeltinin püskürtülerek kurutulması sırasında, başlangıçtaki levofloksasinin kristal yapısının bir miktar korunduğuna işaret etmektedir. XRD analizi sonuçları da bu bulguyu destekler niteliktedir.

XRD analizi sonucunda da görülebileceği gibi levofloksasin-asetilsistein ve levofloksasin-dornaz alfa içeren inhaler tozları amorfudur. Bununla birlikte DSC grafiklerinde herhangi bir yeniden kristalizasyon piki tespit edilmemiş ve levofloksasin-dornaz alfa ile elde edilen yayvan pik dışında su kaybını işaret eden kuvvetli bir pik de görülmemiştir. İki formülasyona ait eğride de 100-190°C arasında gözlenen bir kayma olmasına rağmen yeniden kristalizasyon belirgin değildir. Bu durum, her iki formülasyonda da düşük erime noktalı levofloksasin kristallerinin erimesini gösteren 220°C civarında görülen küçük endotermik pikleri açıklamaktadır. Levofloksasin-asetilsistein içeren inhaler tozu ile 110°C'de asetilsisteinin erimesini gösteren pik gözlenmemiştir. Formülasyonda asetilsistein miktarı levofloksasine göre çok düşük olduğu için gözlenmesi gereken pik, bu bölgedeki kaymadan dolayı görülememiş olabilir. Ayrıca levofloksasin ile karşılaştırıldığında asetilsisteinin miktarı düşük olduğu için; asetilsistein, levofloksasin partikülleri arasında hapsolmuş, bu nedenle de asetilsisteinin erime piki görülmemiş olabilir. Bu durum siprofloksasin-asetilsistein formülasyonunda gözlenmemiştir, çünkü siprofloksasin süspansiyon halinde olduğu için; asetilsistein, siprofloksasin içerisine girememiş ve yüzeyde kurumuştur.

Bütün bu DSC sonuçları, ilaçların izopropil alkol içinde çözünmesinin ve KTİ hazırlamak amacıyla kullanılan yöntemlerin (bilyalı değirmen, homojenizasyon ve püskürterek kurutma) maddelerin yapısını ve termal davranışlarını etkilediğini göstermektedir.

5.3.4. TGA Analizi

TGA analizlerinin sonuçları, analiz edilen tozlardaki sıvı (su veya izopropil alkol) içerikleri açısından değerlendirilmiştir. İşlem görmemiş etkin maddelere ait

TGA sonuçları Tablo 4.1. ve Şekil 4.15.-Şekil 4.17.'de, üretilen KTİ'lere ait sonuçlar ise Tablo 4.15. ve Şekil 4.56.-Şekil 4.61.'de verilmiştir.

TGA sonuçları, işlem görmemiş siprofloksasinin %5,97 su içeriğine sahip olduğunu göstermiştir. Siprofloksasinin izopropil alkol içindeki mikro kristallerinin kurutulması ile bu su içeriği uzaklaştırılmış ve üretilen KTİ'ler izopropil alkolden arındırılmıştır. Siprofloksasin içeren formülasyonlardan sadece dornaz alfa içeren KTİ'de, TGA analizi sırasında % 0,26'lık ağırlık kaybı ölçülmüştür.

İşlem görmemiş levofloksasinin nem içeriği %2,33 olarak bulunmuştur. Sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ formülasyonları ile sırasıyla %2,25, %1,32, %3,47 ağırlık kaybı elde edilmiştir. Levofloksasin içeren KTİ'lerde gözlenen ağırlık kaybının su içeriği mi, izopropil alkol içeriği mi olduğu değerlendirilmiştir. Levofloksasin, izopropil alkolde çözülmüş formunda iken püskürtülüp kurutulduğu için, bu değişimin izopropil alkolden kaynaklanabileceği düşünülse de elde edilen diğer sonuçlar, değişimin su içeriği kaynaklı olabileceğini göstermektedir.

Levofloksasin içeren KTİ'lere ait DSC analizinde, su içeriğini işaret eden 100°C civarındaki dalgalanmaların varlığı, değişimin su kaynaklı olduğunu destekler niteliktedir. Siprofloksasin içeren formülasyonlarda böyle bir ağırlık kaybı gözlenmediği için, püskürterek kurutma aşamasında tercih edilen giriş sıcaklığının izopropil alkolü uzaklaştırmaya yeterli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca sulu olmayan ortamın, ilaçların suya maruz kalmasını önlediği ve tozda halihazırda bulunan nem içeriğini azalttığı (272) göz önünde bulundurulduğunda, teorik olarak, sistemden hem suyun hem de izopropil alkolün uzaklaşması beklenmektedir. Bununla birlikte kaynama noktaları göz önünde bulundurulduğunda, suyu bile uzaklaştıran kurutma koşullarının izopropil alkolü daha kolay uzaklaştıracığı düşünülmekte, ortamdan su uzaklaşırken izopropil alkol kalıntısı bulunması teorik olarak mümkün görünmemektedir. Bu noktada, levofloksasin içeren KTİ'lerin amorf yapıda oldukları göz önünde bulundurularak; izopropil alkol içinde çözülmüş levofloksasinin püskürtülüp kurutulması ile elde edilen tozun, bu işlem ile su ve izopropil alkol içeriğinden arındığı, takip eden süreçte amorf yapısı dolayısıyla higroskopik özellik

göstererek nem çektiği düşünülmektedir. XRD analizi sonuçları da levofloksasin içeren formülasyonların amorf yapıda olduklarını desteklemektedir.

Ayrıca diğer siprofloksasin içeren formülasyonlarda ağırlık kaybı gözlenmezken, siprofloksasin-dornaz alfa formülasyonunun %0,26 oranında ağırlık değişkenliği göstermesi ve levofloksasin-dornaz alfa formülasyonunun diğer levofloksasin içeren formülasyonlardan daha fazla ağırlık değişkenliği göstermesi (%3,47), bu değişkenliklerin Pulmozyme® preparatı içerisindeki sudan da etkilendiğini düşündürmektedir.

5.3.5. XRD Analizi

İşlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ve püskürtülerek kurutulan formülasyonların XRD difraktogramları, tozların kristal ve amorf yapılarını göstermek için kullanılmaktadır (Bkz. Şekil 4.18.-Şekil 4.22., Şekil 4.62.-Şekil 4.67.). XRD analizleri yapılarak elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (249-251, 256-258). Elde edilen sonuçlar, çalışmada kullanılan işlem görmemiş maddelerin kristal yapıda olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 4.18.-Şekil 4.20.) (258-260).

Siprofloksasin içeren formülasyonların XRD analizleri; bilyalı değirmen, yüksek basınçlı homojenizasyon ve püskürterek kurutma işlemleri sırasında siprofloksasinin kristal formunun değişmediğini açıkça göstermektedir. Siprofloksasin içeren formülasyonlar, süspansiyondan hareketle hazırlandığı için kristal form korunmuştur.

Diğer taraftan, püskürterek kurutma işlemi sırasında levofloksasinin kristal formunun amorf forma dönüştüğü görülmektedir. Levofloksasin içeren formülasyonlar, çözeltiden hareketle hazırlandığı için kristal form korunamamıştır. Sadece levofloksasin içeren KTİ ile elde edilen XRD analizi sonuçları incelendiğinde, kısmi bir kristal yapıyı işaret eden pikler görülmüştür. Bu sonuç, DSC analizi sonucunda sadece levofloksasin içeren formülasyona ait 80-100°C'deki su içeriğine işaret eden pikin de, kristal suyunun muhafaza edilmesi sonucu oluştuğunu düşündürmektedir.

Formülasyonda ilacın kristal yapısının korunması, KTİ'lerin raf ömrü süresince stabilitesini koruması yönünden özellikle önemlidir. Amorf form genel

olarak kristal formdan daha hızlı bir çözünme hızına sahip olmakla birlikte, amorf toz genellikle daha higroskopiktir ve solunabilirliği daha düşük ama daha kararlı olan kristal forma dönme eğilimindedir (273).

XRD difraktogramlarında antibiyotiklere ait piklerin dışında görülen pikler, formülasyonlara eklenen mukolitiklerden kaynaklanıyor olabilir. KTİ formülasyonlarında ilaç piklerinin yoğunluğundaki değişiklikler, antibiyotikler ile mukolitikler arasındaki etkileşimin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Siprofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-asetilsistein içeren fiziksel karışımların XRD difraktogramları, işlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsisteine ait difraktogramlar ile uyumlu bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.21.-Şekil 4.22.). Bu durum da maddelerin bir arada bulunmasının kristal yapıyı değiştirmedini göstermektedir.

Elde edilen XRD analizi sonuçları göstermiştir ki, üretim yöntemi parametrelerinin değiştirilmesi ile, kristal formun korunması veya kristal formdan amorf forma geçiş mümkündür. Bu tez kapsamında, püskürtülerek kurutulan karışımın çözelti veya süspansiyon oluşu, elde edilen tozun kristal ya da amorf olması üzerinde kritik etkiye sahiptir.

5.3.6. SEM Analizi

Ham maddeler ve üretilen tozların, partikül büyüklüğü dağılımlarının yanı sıra partikül yüzey morfolojilerini de değerlendirmek amacıyla SEM görüntülemesi yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntem ile mikron boyutundaki partiküllerin başarılı bir şekilde görüntülenmesi mümkündür.

İşlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin, asetilsistein ve KTİ'lerin SEM görüntüleri Şekil 4.23.-Şekil 4.25. ve Şekil 4.68.-Şekil 4.73.'te verilmiştir. İşlem görmemiş etkin maddelerin SEM görüntüleri, XRD deneyinden elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak, bu maddelerin iğne şeklinde, kristal, rijit bir yapıya sahip olduklarını göstermiştir. Ayrıca SEM görüntülerinin, partikül büyüklüğü dağılımı sonuçlarıyla da uyumlu olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.23.-Şekil 4.25.). Bilyalı değirmen, homojenizasyon ve püskürterek kurutma yöntemleri ile yapılan mikronizasyon işlemlerinden sonra, formülasyona giren maddelerin partikül büyüklüklerinin önemli derecede azaldığı gözlenmiştir.

Siprofloksasin içeren formülasyonlar (sadece siprofloksasin içeren, siprofloksasin-asetilsistein içeren, siprofloksasin-dornaz alfa içeren), bilyalı değirmen ile öğütülmüş ve homojenize edilmiş siprofloksasin partiküllerinin süspansiyonundan hareketle hazırlandığından, püskürtülerek kurutulduktan sonra da öğütülmüş toz morfolojisini kısmen koruyarak, katı fakat yumuşak yüzeyli bir disk şekli görüntüsü vermişlerdir.

Sadece siprofloksasin içeren ve siprofloksasin-asetilsistein içeren formülasyonların, partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları ile uyumlu partikül büyüklüklerine sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca partikül büyüklüğü dağılımı grafiğinden de gözlemlenen, çift tepeli (bimodal) dağılım gösteren, büyük (2-3 μm) ve göreceli olarak küçük partiküllere sahip oldukları görülmüştür. Siprofloksasin-asetilsistein içeren formülasyonda bu görüntü daha belirgindir. Çünkü söz konusu formülasyon, siprofloksasin süspansiyonu ve asetilsistein çözeltisi içeren karışımın püskürtülerek kurutulması ile hazırlanmıştır. Bu nedenle asetilsistein çözeltisi siprofloksasin partikülleri üzerinde kurumuştur. Bu sistemde asetilsistein derişimi oldukça düşük olduğundan, asetilsistein partikülleri göreceli olarak daha küçüktür.

Siprofloksasin-dornaz alfa içeren formülasyona ait SEM görüntüleri, büyük disk şekilli parçacıkların yüzeyinde küçük yuvarlak partiküllerin biriktiğini göstermiştir. Bunun nedeni siprofloksasin süspansiyonunun Pulmozyme® çözeltisi ile hazırlanıp püskürtülerek kurutulmasıdır. Pulmozyme® preparatı içerisindeki dornaz alfa molekülleri ve tuzlar, kurutma işlemi sırasında süspande haldeki siprofloksasin partiküllerinin yüzeyinde kurumuştur. Püskürtülerek kurutulan karışımdaki dornaz alfa derişimi düşük olduğu için, kuruma sonrası siprofloksasin partiküllerinin yüzeyinde kuruyan dornaz alfa partikülleri göreceli olarak daha küçüktür. Siprofloksasin-dornaz alfa KTİ'lerinin partikül boyutu analizi sonuçları da bimodal partikül boyutu dağılımını doğrular niteliktedir. Partikül yüzeyinin diğer siprofloksasin içeren formülasyonlardan farklı olması, Pulmozyme® preparatının içeriğindeki tuzlardan ve sudan kaynaklanmaktadır. Preparatın içeriğindeki su ile, süspande haldeki siprofloksasinin bir miktar çözündüğü varsayılmaktadır, bu da partikül morfolojisini değiştirmiştir.

Siprofloksasin içeren formülasyonlardan elde edilen SEM görüntüleri teorik olarak değerlendirildiğinde, önce mukolitiğin mukus ile temas edip viskoziteyi düşüreceği, sonra da siprofloksasinin mukus içerisine daha etkili nüfuz edeceği sonucuna varılabilir. Siprofloksasin içeren formülasyonlar ile levofloksasin içeren formülasyonların SEM görüntülerinin oldukça farklı olduğu gözlenmiştir.

Siprofloksasin içeren formülasyonlardan farklı olarak, levofloksasin içeren KTI'ler, ilaçların (antibiyotik ve mukolitik) izopropil alkoldeki çözeltisinden hareketle hazırlandığı için, bu formülasyonlar ile çökmüş küresel partikül görüntüsü elde edilmiştir. Bu formülasyonların Mastersizer ile ölçülen partikül büyüklüğü dağılımı homojendir ve bu sonuçlar SEM görüntülerini desteklemektedir. Levofloksasin içeren formülasyonların, üretim işleminden sonra kristal yapılarının değiştiği ve daha amorf bir görüntüye sahip oldukları gözlenmiştir. Dornaz alfa, levofloksasin içeren formülasyona eklendiğinde, pürüzlü ve granül yapısında partiküller elde edilmiştir. Bu durum Pulmozyme® preparatının içerdiği suyun ve tuzların, damladan partiküle geçiş aşamasında, yani kurutma sırasında partikül oluşturma davranışını değiştirmesinden kaynaklanmaktadır.

5.3.7. Partikül Büyüklüğü Dağılımı Analizi

Etkin maddelerin partikül büyüklüğü dağılımı incelenmiş, işlem görmemiş siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein için sırasıyla ortalama hacim çapı (d_{50}) 14,61 μm , 31,59 μm , 386,37 μm olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.2.). Ayrıca partikül büyüklüğü dağılımları incelendiğinde, işlem görmemiş siprofloksasin ve levofloksasinin oldukça geniş bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip oldukları, işlem görmemiş asetilsisteinin göreceli olarak daha tekdüze bir dağılım gösterdiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.26.-Şekil 4.27.). Bu veriler SEM görüntüleri ile de uyumludur.

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında, bilyalı değirmen yöntemini optimize etmek amacıyla, bilyalı değirmen ile farklı koşullarda çalışılmış ve değiştirilen parametrelerin partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla siprofloksasinin izopropil alkoldeki dispersiyonu kullanılmıştır. Teorik olarak süspansiyonun katı içeriği (%) azaldıkça, elde edilen partiküllerin küçülmesi

beklenmektedir. Bizim çalışmamızda katı içeriği %2'den %1'e düştüğünde partikül büyüklüğü azalarak, d_{90} değeri 21 μm 'den 14 μm 'ye düşmüştür. Katı içeriği %1'den %0,5'e düştüğünde ise partikül büyüklüğünde artış gözlenmiştir. Sonuç olarak %1 katı içeren süspansiyon ile en düşük partikül boyutuna ulaşılmış (300 rpm, 15 dk.), katı içeriğini %1'in altına düşürmenin ise anlamlı olmadığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.74.).

Bilyalı değirmen yönteminde, teorik olarak işlem süresi arttıkça, partikül büyüklüğünün azalması beklenmektedir. Bizim çalışmamızda işlem süresi 15 dk.'dan 60 dk.'ya çıkarıldığında d_{90} değeri 14 μm 'den 13 μm 'ye düşmüş, 60 dk.'dan 120 dk.'ya çıkarıldığında partikül büyüklüğü artmıştır. Sonuç olarak 60 dk. işlem süresi ile en düşük partikül boyutuna ulaşılmış (300 rpm, %1 katı içeriği), işlem süresinin 60 dk.'nın üzerine çıkarılmasının anlamlı olmayacağı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.74.).

Bilyalı değirmen yönteminin bir diğer değişkeni olan dönüş hızının (rpm) partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelenmiştir ve en dramatik etki bu parametrenin değişimi ile elde edilmiştir. Dönüş hızı 100 rpm'den 200 rpm'ye çıkarıldığında d_{90} değeri 102 μm 'den 34 μm 'ye, 200 rpm'den 300 rpm'ye çıkarıldığında d_{90} değeri 34 μm 'den 14 μm 'ye düşmüştür. Sonuç olarak 300 rpm dönüş hızı ile en düşük partikül boyutuna ulaşılmıştır (15 dk., %1 katı içeriği) (Bkz. Şekil 4.74.). Fakat inhalasyon için gerekli partikül boyutuna bu yöntem ile ulaşamamıştır. Dönüş hızının 300 rpm'nin üzerine çıkarılması ile elde edilen süspansiyonda gözle görülür safsızlıklar bulunması ve işlem sırasında oluşan sürtünme ve ısının antibiyotiklerin stabilitesi üzerinde olumsuz etki gösterebileceği göz önünde bulundurularak, dönüş hızı 300 rpm'nin üzerine çıkarılmamıştır.

Sadece bilyalı değirmen yöntemi ile partiküllerin solunabilir boyuta getirilemeyeceği görülmüş ve üretim aşamasına yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi eklenmiştir. Yeni durumda bilyalı değirmen, sadece homojenizatörün *chamber* porlarının tıkanmaması ve homojen bir süspansiyon elde etmek için bir ön öğütme yöntemi olarak kullanılmıştır.

Yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminde teorik olarak, işlem sayısı arttıkça partikül boyutunun küçülmesi beklenmektedir. Çalışma kapsamında basınç

sabit tutulup (20.000 PSI) işlem sayısı artırılmış (20, 30, 40, 50 defa), en düşük d_{90} değeri 40 defa homojenizasyon ile elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.75.).

Üretilen formülasyonların ortalama partikül boyutları; siprofloksasin, siprofloksasin-asetilsistein, siprofloksasin-dornaz alfa, levofloksasin, levofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-dornaz alfa içeren formülasyonlar için sırasıyla; 0,79 μm , 0,73 μm , 1,36 μm , 2,10 μm , 1,99 μm , 2,14 μm olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.16.). Her koşulda, KTİ formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü, işlem görmemiş maddelere kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($p < 0,05$). Formülasyonların partikül büyüklüğü alveollere kadar ulaşabilmek için uygun olmakla birlikte, aerodinamik çap değeri ölçülmeden kesin yargıya varmak mümkün değildir.

Formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımları incelendiğinde, siprofloksasin içeren formülasyonların bimodal, levofloksasin içeren formülasyonların tek tepeli (unimodal) dağılım gösterdiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.76.-Şekil 4.77.). Formülasyonların üretim yöntemleri göz önüne alındığında bu durum beklenen bir sonuçtur. Süspansiyonun püskürtülüp kurutulması ile hazırlanan siprofloksasin içeren formülasyonlarda, süspande siprofloksasin belli bir partikül büyüklüğünde, çözelti halindeki asetilsistein veya dornaz alfanın kuruması ile elde edilen partiküller ise daha küçük boyuttadır. Bu durum da çift tepeli dağılıma neden olmaktadır.

Çözeltinin püskürtülerek kurutulması ile üretilen levofloksasin içeren formülasyonlarda ise hem levofloksasin hem de asetilsistein veya dornaz alfa çözelti halinde olduğu için kuruma ile tekdüze partiküller elde edilmiştir ve bu durum da tek tepeli dağılım elde edilmesini sağlamıştır. Sonuçlar SEM analizi ile uyumludur.

Mukolitik ajan olan dornaz alfa, KTİ formülasyonlarına ilave edildiğinde, tek başına antibiyotik içeren KTİ'lere kıyasla d_{50} değerinde hafif bir artış gözlemlenmiştir. Fakat bu değer hala solunabilir aralıkta kalmıştır. Bu artışın, Pulmozyme® preparatındaki su ve tuz içerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bilindiği üzere genel olarak, püskürtülerek kurutulacak olan ortamda su oranı arttıkça partikül büyüklüğü de artmaktadır (236, 237). Bununla birlikte su miktarı izopropil alkol miktarından çok düşük olduğu için dramatik bir artış gözlenmemiştir. Partikül

büyüküğü dağılımı sonuçları, üretilen KTİ'lerin akciğere uygulanmak için uygun olabileceğini göstermiştir (274).

5.4. Formülasyonların Antibiyotik ve Mukolitik İçeriklerinin Tayini

KTİ'lerin antibiyotik ve mukolitik içeriğı sonuçları Tablo 4.17.'de gösterilmektedir.

Sadece antibiyotik içeren KTİ'lerin ilaç içeriğı %95'ten daha yüksektir ve su içerikleri göz önünde bulundurulduğunda, bu değeri kabul edilebilirdir. Levofloksasin içeren formülasyonların antibiyotik içeriğı siprofloksasin içeren formülasyonlara göre daha düşüktür. HPLC kromatogramlarında safsızlığa işaret eden pikler tespit edilmediğinden, gözlenen ilaç içeriğindeki azalma, çözülden hareketle kurutma işleminden kaynaklanan bir verim azalması olarak değerlendirilmiştir.

FT-IR sonuçları, her iki antibiyotikteki kimyasal yapıların, KTİ formülasyonlarında korunduğunu ve dolayısıyla üretim sürecinin veya mukolitik ilavesinin siprofloksasin ve levofloksasinin stabilitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

5.5. Çözünürlük Tayini

Siprofloksasin pH'ya bağımlı çözünürlük gösterdiğinden (238), mukolitik bir ajan varlığında siprofloksasinin çözünürlüğünün değışip değışmediğı incelenmiştir (Bkz. Tablo 4.18.-Tablo 4.19., Şekil 4.80.). Mukolitik içeren formülasyonlardaki siprofloksasinin çözünürlüğü incelenmiş, referans olarak işlem görmemiş siprofloksasin ile sadece siprofloksasin içeren formülasyonun çözünürlük değeri alınmıştır. İşlem görmemiş siprofloksasin, sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ formülasyonlarının çözünürlükleri sırasıyla $0,324 \pm 2,480$ mg/mL, $0,293 \pm 0,006$ mg/mL, $0,348 \pm 0,022$ mg/mL, $0,316 \pm 0,013$ mg/mL olarak bulunmuştur. Çözünürlük değeri arasında fark bulunmamıştır. Bu sonuç da mukolitik varlığının siprofloksasinin çözünürlüğünü değıştirmediğini göstermektedir.

Levofloksasin, BSS Sınıf I ilaçtır yani çözünürlüğü yüksektir (208, 209). Bu nedenle, levofloksasin içeren formülasyonlar için çözünürlük tayini çalışması yapmak anlamlı bulunmadığından yapılmamıştır.

5.6. Çözünme Deneyi

KTİ formülasyonlarının performansını değerlendirmek ve in vivo koşullarda çözünme davranışlarını öngörmek amacıyla, özellikle çözünürlüğü düşük ilaçlara in vitro çözünme çalışmaları yapılmaktadır. İşlem görmemiş siprofloksasin ve siprofloksasin içeren KTİ'lerin (sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ) çözünme profilleri çizilmiş ve Weibull denklemi ile çözünme süreleri hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.20.-Tablo 4.21., Şekil 4.81.).

İşlem görmemiş siprofloksasin, sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için çözünme süreleri sırasıyla 5,9 sa., 1,6 sa., 2,9 sa. ve 2,8 sa. olarak bulunmuştur. Sonuçlar, işlem görmemiş siprofloksasin ile karşılaştırıldığında, mikronizasyon işleminden sonra siprofloksasinin çözünme süresinin belirgin olarak azaldığını göstermiştir. Mikronizasyon işlemi ile partiküller küçülmüş, buna bağlı olarak da yüzey alanları artmıştır. Artan yüzey alanı, çözücüye temas eden yüzeyi de artırdığından mikronize tozlarda çözünme süresinin azalması beklenen bir sonuçtur.

Sadece siprofloksasin içeren KTİ formülasyonu, mukolitik içeren formülasyonlara kıyasla daha hızlı bir çözünme göstermiştir. Bu durum da ikinci bir bileşiğin varlığının (mukolitik) çözünme hızını düşürmesinden kaynaklanmaktadır. Üretim yöntemi ve SEM görüntüleri göz önünde bulundurulduğunda, mukolitiklerin siprofloksasin partiküllerinin yüzeyinde bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle, teorik olarak mukolitik içeren formülasyonlarda siprofloksasinin çözünmesi için önce mukolitiğin çözünmesi gerekmektedir, bu durumun da siprofloksasinin çözünmesinin yavaşlamasına neden olduğu düşünülmektedir.

Levofloksasinin, hızlı ve yüksek çözünme özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir. Sadece levofloksasin içeren formülasyon ve işlem görmemiş levofloksasin ile çözünme deneyi yapıldığında, her iki koşulda da 15 dk.'da

levofloksasinin % 95'inin çözüldüğü görülmüştür (Bkz. Tablo 4.22., Şekil 4.82.). Bu nedenle levofloksasin içeren diğer formülasyonlar (levofloksasin-asetilsistein, levofloksasin-dornaz alfa) ile çözünme deneyi yapılmamıştır.

5.7. Aerodinamik Parametrelerin Değerlendirilmesi

KTİ'lerin solunabilirliğini ifade eden aerodinamik parametreler Tablo 4.23.- Tablo 4.40. ve Şekil 4.83.-Şekil 4.94.'te verilmektedir. Her bir ACI deneyinden önce ve sonra, aygıt ve dolu kapsülün toplam ağırlığı ölçülmüş, aradaki fark hesaplanmıştır. Bu sonuçlar da deney sırasında, yüklenen KTİ'nin ne kadarının aygıttan uzaklaştığı ile ilgili bir ön bilgiye ulaşmayı sağlamıştır. Başlangıç ve işlem sonrası (3 puf) ağırlık farkı değerleri sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla 19,30 mg, 21,03 mg, 24,23 mg; sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla 20,93 mg, 25,45 mg, 29,40 mg olarak bulunmuştur. Karşılaştırılabilir sonuçlar elde etmek amacıyla yüklenen KTİ'lerin aynı miktarda antibiyotik içermeleri sağlanmıştır. Bu nedenle de her bir formülasyon için yüklenen KTİ miktarı farklıdır. Sonuç olarak elde edilen başlangıç ve işlem sonrası ağırlık farkı değerleri karşılaştırılabilir değildir fakat ön bilgi elde etmek yönünden faydalıdır. Bu nedenle, elde edilen ağırlık farkı değerleri *emitted dose* değeri olarak kullanılmamıştır.

Emitted dose, aygıt ve kapsül dışındaki tüm sistemin yıkanması ile HPLC analizinden elde edilen toplam baz antibiyotik miktarı olarak hesaplanmıştır. *Emitted dose*, sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla 14,79 mg, 15,67 mg, 15,02 mg; sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla 17,14 mg, 17,18 mg, 19,10 mg olarak bulunmuştur. *Emitted dose* yüzdesi, aygıt ve kapsül dışındaki tüm sistemin yıkanması ile HPLC analizinden elde edilen toplam antibiyotik miktarının, yüklenen antibiyotik miktarına oranlanması ile hesaplanmıştır. Sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla %53,75, %58,26, %56,62; sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla %62,22, %62,02, %69,03 olarak bulunmuştur. İşlem sonrasında aygıt açılıp kontrol edildiğinde, kalan tozların aygıtta değil, kapsülde olduğu

gözlenmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere levofloksasin içeren KTİ formülasyonları, siprofloksasin içeren KTİ formülasyonlarına göre daha fazla antibiyotiğin aygıt ve kapsülden uzaklaşabilmesini, dolayısıyla solunum sistemine girebilmesini sağlamıştır. Bu farkın hazırlama yöntemindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülebilir. Çözelti formundan püskürtülerek kurutulan levofloksasin içeren KTİ'lerin, süspansiyon formundan püskürtülerek kurutulan siprofloksasin içeren KTİ'lere göre daha düşük dansiteye sahip olmaları, aerosolize olabilmeye yeteneklerini artırmıştır. Mukolitik varlığı, antibiyotiklerin aygıt ve kapsülü terk edebilme yeteneklerini azaltmamış, aksine iki antibiyotik için de bir miktar artış sağlamışlardır. Formülasyonlara mukolitik eklenmesinin nedeni, mukus viskozitesini azaltıp, antibiyotik etkinliğini artırmak olmakla birlikte, mukolitik varlığının aerodinamik özellikleri iyileştirmesi beklenmeyen fakat istenen bir durumdur. Aygıt ve kapsülü terk edebilme yeteneğinin en az sadece siprofloksasin içeren KTİ, en çok levofloksasin-dornaz alfa KTİ formülasyonlarında olduğu görülmüştür. Bilindiği üzere KTİ formülasyonlarının aygıt ve kapsülü terk edip solunum sistemine geçebilmeleri, istenen etki bölgelerine ulaşabileceklerini göstermemektedir.

Formülasyonların KOAÇ değerleri hesaplanmış ve sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla 2,60 μm , 3,06 μm , 2,87 μm ; sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla 2,82 μm , 2,29 μm , 3,21 μm olarak bulunmuştur. Siprofloksasin içeren KTİ'lerin hacim çapları levofloksasin içeren KTİ'lerin hacim çaplarına göre daha düşük olmalarına rağmen, elde edilen KOAÇ değerleri oldukça yakındır. Bu sonuç da çözelti formundan hazırlanan levofloksasin içeren formülasyonların dansitelerinin, süspansiyondan hareketle hazırlanan siprofloksasin içeren formülasyonların dansitelerinden daha düşük olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte tüm formülasyonlar için KOAÇ değerleri, akciğerlerin derinlerine ulaşmak için uygun aralıktadır.

İnce partikül dozu (İPD), 5 μm 'den küçük partikül boyutuna sahip yani teorik olarak alveollere ulaşabilecek antibiyotik miktarı olarak hesaplanmıştır. Sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla 12,14 mg, 11,60 mg, 11,25 mg; sadece levofloksasin içeren KTİ,

levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla 13,79 mg, 14,72 mg, 12,60 mg olarak bulunmuştur. Levofloksasin içeren formülasyonlar ile siprofloksasin içeren formülasyonlara kıyasla daha yüksek miktarda antibiyotiğin alveollere ulaştığı görülmüştür. En yüksek İPD levofloksasin-asetilsistein KTİ, en düşük İPD siprofloksasin-dornaz alfa KTİ formülasyonları ile elde edilmiştir. *Emitted dose*'dan farklı bir sıralama elde edildiği görülmüştür. Bu da KTİ'lerin aygıt ve kapsülü terk etme performansı ile alveollere ulaşma performansının her zaman doğru orantılı olmayacağını göstermektedir.

İnce partikül fraksiyonu (İPF), 5 µm'den küçük partikül boyutuna sahip yani teorik olarak alveollere ulaşabilecek antibiyotik miktarının *emitted dose*'a oranlanması ile elde edilmiştir. Sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla %82,17, %74,02, %75,29; sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla %80,46, %85,73, %65,99 olarak bulunmuştur. En düşük İPF değeri levofloksasin-dornaz alfa KTİ ile, en yüksek İPF değeri levofloksasin-asetilsistein KTİ ile elde edilmiştir. İPF değeri, aygıt ve kapsülü terk eden formülasyonun ne kadarının alveollere ulaşabileceğini gösteren bir değerdir. İPD değeri aynı olan iki KTİ formülasyonundan *emitted dose*'u düşük olanın İPF'si yüksek olacaktır veya hem İPD'si hem de *emitted dose*'u düşük olan formülasyonların İPF'si yüksek olacaktır. Bu nedenle İPF değerinin tek başına yüksek olması, aerosolizasyon performansını değerlendirmek için yeterli bir veri değildir. Fakat İPF değerinin düşük olması, üretilen formülasyonun aygıt ve kapsülü terk ettiği ancak respiratuar bölgeye ulaşmadan solunum sisteminin üst bölgelerinde (boğaz, trake gibi) takılan madde miktarının yüksek olduğu anlamına gelmektedir (181, 275-277).

Elde edilen tüm formülasyonlarda, filtreye ulaşan madde miktarı ihmal edilebilir derecede azdır. Bu da soluk verme ile solunum sisteminden atılma ihtimali olan partikül miktarının ihmal edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir.

5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Etkin maddelerin absorpsiyonu, toksisitesi veya klerensi gibi özelliklerini inceleyebilmek için hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Calu-3 hücreleri (akciğer

adenokarsinoma hücreleri) insan hava yolu epitel bariyeri modeli oluşturmak için en uygun hücre hatlarından biridir (194-198, 278). Yapılan çalışmalarda Calu-3'ün sıvı kaplı (LCC) ve hava arayüzeyindeki (AIC) kültürleri, morfolojileri ve permeabiliteleri açısından karşılaştırılmış, AIC hücrelerin akciğer yapısını (mukus üretimi, trans-epitelyal direnç, morfoloji ve transporter üretimi) daha iyi yansıttığı gözlenmiştir (196, 197). Calu-3 hücre hattı kullanılarak siprofloksasin maddesinin permeabilite tayini yapılmış, siprofloksasinin *influx* ve *efflux* substratı olduğu görülmüştür (197, 199).

Permeabilite çalışması kapsamında Calu-3 hücreleri, hem hava arayüzeyinde hem de sıvı arayüzeyinde çoğaltılmış, formülasyonlar hem çözelti şeklinde hem de katı olarak uygulanmıştır. Hava arayüzeyinde yetiştirilen Calu-3 hücrelerinin yüzeyinde, akciğer epitelyal dokusunda olduğu gibi, mukus tabakası olduğu bilinmektedir (194, 195).

Permeabilite çalışması öncesinde ve sonrasında yapılan TEER ölçümü ile hücre tek tabaka bütünlüğü değerlendirilmiştir. TEER değerleri, *transwell* insertlerin yüzey alanına, ekilen hücre sayısına, filtreye, kültür koşullarına ve pasaj sayısına bağlıdır ve 152-2412 ohm.cm² arasında değişebilmektedir. Kültürdeki membran potansiyelini ve epitel hücrelerin rezistansını güvenilir bir şekilde ölçen Millicell-ERS, kalitatif olarak hücre tek tabaka bütünlüğünü ve kantitatif olarak hücre sıklığını ölçer. Tez çalışması kapsamında Calu-3 hücrenin TEER değerleri LCC ve AIC koşulları altında, formülasyonların çözelti veya toz halinde uygulanmasından önce ve sonra ölçülmüştür. Calu-3 hücre hattının LCC koşullarındaki TEER değerlerinin (yaklaşık 1000 ohm.cm⁻²), AIC koşullarındaki değerlerden (yaklaşık 400-450 ohm.cm⁻²) daha yüksek olduğu görülmüştür (278). Bu değerler literatürle uyumludur ve uygulama öncesi ve sonrası istenen hücre tek tabakalarının elde edildiğini göstermektedir (247). AIC koşullarında üretilen Calu-3 hücrelerinin TEER değeri daha düşük olmasına rağmen, LCC ile kıyaslandığında AIC, akciğer koşullarına benzer hava yolu epiteli morfolojisi ve elektrik direncine sahip olduğundan, *in vivo* koşulları daha iyi taklit etmektedir (278).

MTT yöntemi canlı hücrelerin renksiz ya da az renkli MTT'yi (3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid)'yi, renkli formazan türevlerine dönüştürmesi esasına dayanır. Yöntem ilk kez 1983 yılında Mosmann tarafından

immünolojik çalışmalar için hızlı bir kolorimetrik yöntem olarak uygulanmıştır (279). MTT, çoğalan hücrelerde, mitokondriyal süksinik dehidrogenaz enzimi tarafından formazana (kırmızı) dönüşür. Sadece indirgenen formazan spektrofotometrik olarak ölçülebilir, bu nedenle orijinal boya ile herhangi bir girişim gerçekleşmesi söz konusu değildir.

MTT testi ile hücrelere 100 ve 500 µg/mL derişimde antibiyotik içeren formülasyonlar uygulanmış, hücrelerin 24 saat sonraki canlılığı değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hazırlanan çözeltilerin hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu veriler doğrultusunda 250 µg/mL (0,65 mM) siprofloksasin, 430 µg/mL (1,161 mM) levofloksasin içeren derişimlerde KTİ çözeltileri uygulamasının da hücrelerin canlılığını olumsuz yönde etkilemeyeceği öngörülmüştür. TEER çalışması sonuçları da bu çıkarımı destekler niteliktedir.

Katı formülasyon uygulama aşamasında Dry Powder Insufflator™ aygıtı kullanılmıştır. Bu aygıt 1-5 mg kuru tozu havada aerosolize ederek uygulama imkanı vermektedir. İnhalasyon koşullarını daha iyi yansıtacağı için bu yöntem tercih edilmiştir. TEER ölçümleri ile hücre bütünlüğünün korunduğu görülmüştür.

Permeabilite sonuçları Tablo 4.42. ve Şekil 4.96.-Şekil 4.97.'de verilmiştir. Hava ara yüzeyinde katı olarak uygulanan işlem görmemiş siprofloksasin ve işlem görmemiş levofloksasinin permeabiliteleri sırasıyla $0,329.10^{-6}$ cm/sn ve $4,281.10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Beklendiği gibi levofloksasinin permeabilitesi siprofloksasinin permeabilitesinden daha yüksektir (278). Tez kapsamında sistemik değil lokal etki beklediği için siprofloksasinin permeabilitesinin görece düşük olması bir üstünlük olarak değerlendirilmiştir. Yine hava ara yüzeyinde katı olarak uygulanan siprofloksasin-asetilsistein, levofloksasin asetilsistein fiziksel karışımlarından antibiyotik permeabilitesi sırasıyla $1,452.10^{-6}$ cm/sn ve $4,310.10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Sonuçlardan da görüldüğü üzere asetilsistein varlığı siprofloksasinin permeabilitesini artırırken, levofloksasinin permeabilitesinde bir değişiklik olmamıştır.

Sıvı ara yüzeyine çözelti olarak uygulanan sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için permeabilite değerleri sırasıyla $4,328.10^{-6}$ cm/sn, $4,264.10^{-6}$ cm/sn, $4,337.10^{-6}$ cm/sn; sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla $6,024.10^{-6}$ cm/sn, $6,250.10^{-6}$ cm/sn, $6,492.10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar yine levofloksasinin permeabilitesinin siprofloksasinden yüksek olduğunu göstermiştir. Mukolitik eklenmesi siprofloksasinin permeabilitesini değiştirmezken, levofloksasinin permeabilitesi bir miktar artmıştır.

Sıvı ara yüzeyine toz olarak uygulanan sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için permeabilite değerleri sırasıyla $0,421.10^{-6}$ cm/sn, $0,815.10^{-6}$ cm/sn, $1,103.10^{-6}$ cm/sn; sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla $1,295.10^{-6}$ cm/sn, $2,759.10^{-6}$ cm/sn, $4,650.10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar yine levofloksasinin permeabilitesinin siprofloksasinden yüksek olduğunu göstermiştir. Mukolitik eklenmesi siprofloksasinin de levofloksasinin de permeabilitesini artırmıştır fakat levofloksasindeki artışın daha dramatik olduğu görülmüştür.

Hava ara yüzeyine çözelti olarak uygulanan sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için permeabilite değerleri sırasıyla $5,141.10^{-6}$ cm/sn, $5,275.10^{-6}$ cm/sn, $5,328.10^{-6}$ cm/sn; sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa KTİ için sırasıyla $8,565.10^{-6}$ cm/sn, $9,707.10^{-6}$ cm/sn, $9,739.10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar yine levofloksasinin permeabilitesinin siprofloksasinden yüksek olduğunu göstermiştir. Mukolitik eklenmesi siprofloksasinin de levofloksasinin de permeabilitesini artırmıştır fakat levofloksasindeki artışın daha dramatik olduğu görülmüştür.

Hava ara yüzeyine toz olarak uygulanan sadece siprofloksasin içeren KTİ, siprofloksasin-asetilsistein KTİ, siprofloksasin-dornaz alfa KTİ için permeabilite değerleri sırasıyla $2,758.10^{-6}$ cm/sn, $2,184.10^{-6}$ cm/sn, $1,300.10^{-6}$ cm/sn; sadece levofloksasin içeren KTİ, levofloksasin-asetilsistein KTİ, levofloksasin-dornaz alfa

KTİ için sırasıyla $3,482.10^{-6}$ cm/sn, $5,461.10^{-6}$ cm/sn, $4,629.10^{-6}$ cm/sn olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar yine levofloksasinin permeabilitesinin siprofloksasinden yüksek olduğunu göstermiştir. Mukolitik eklenmesi siprofloksasinin permeabilitesini azaltırken, levofloksasinin permeabilitesini artırmıştır.

Hava ara yüzeyinden elde edilen permeabilite değerlerinin, sıvı ara yüzeyinden elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Teorik olarak sıvı varlığında maddelerin çözünmesine bağlı olarak permeabilitenin artması beklenirken, sıvı yerine mukus tabakası olan ortamda permeabilitenin daha yüksek olması beklenen bir sonuç değildir. Bu durumun hava ara yüzeyinde üretilen hücrelerin TEER değerinin sıvı ara yüzeyinde üretilen hücrelerin TEER değerinden düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Akciğer yüzeyi sıvı ile değil mukus tabakası ile kaplı olduğundan, hava ara yüzeyi ile yapılan çalışmaların in vivo koşulları daha iyi temsil ettiği bilinmektedir (196).

Formülasyonların permeabilitesinin, fiziksel karışımların permeabilitesinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum, mikronize edilmiş maddelerin yüzey alanlarının artmasına bağlı olarak daha hızlı bir çözünme davranışı göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Formülasyonlar çözelti olarak uygulandığında mukolitik varlığının permeabiliteye etkisi daha az görülürken, katı uygulamada mukolitik varlığı permeabiliteyi daha fazla etkilemiştir. Katı olarak uygulamada kuyucuklar arasındaki varyasyon, sıvı olarak uygulamadakine göre daha fazladır. Levofloksasin ile siprofloksasin arasındaki permeabilite farkı hava ara yüzeyine çözelti olarak uygulama ve sıvı ara yüzeyine toz olarak uygulamada belirgin olarak ortaya çıkmıştır.

Formülasyonlar çözelti formunda uygulandığında daha yüksek permeabilite değerleri elde edilmiştir. Buna karşın, formülasyonlar kuru toz halinde uygulandığında daha düşük ve değişken sonuçlar elde edilmiştir.

KTİ'ler tedavi amacıyla toz olarak uygulandığından, hücre kültürü çalışmalarında formülasyonların toz olarak uygulaması ile elde edilen sonuçlar in vivo koşullar açısından daha güvenilirdir. Diğer taraftan, uygulanan tozu çözmek için gerekli sıvı miktarını doğrudan etkileyen, uygulama yüzeyi (hücre kültürü *insert* alanı

veya akciğer yüzey alanı)/toz oranı dikkate alınmalıdır. Mukolitiklerin yokluğunda veya varlığında elde edilen permeabilite değerlerini karşılaştırdığımızda, sadece sıvı ara yüzeyi koşullarında formülasyonların toz olarak uygulanması ile permeabilite değerlerinde fark elde edilmiştir. Bu sonuç, antibiyotiklerin çözünmesi için yeterli sıvı olduğu durumda, mukolitik varlığının antibiyotiklerin permeabilitesini artırabileceğini göstermektedir. Formülasyonlar çözelti olarak uygulandığında, AIC ve LCC koşulları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır, bunun nedeni tüm ilaçların halihazırda çözülmüş olmasıdır. Benzer şekilde, hava ara yüzeyinde üretilen *insert*'lere KTİ'lerin toz formu uygulandığında, inhalerleri çözmek için yeterli sıvı olmadığından mukolitik içeren ve içermeyen formülasyonların permeabiliteleri arasında bir fark gözlenmemiştir.

Elde edilen sonuçların değerlendirilme sürecinde, AIC koşullarında Calu-3 ile üretilen mukusun kistik fibrozis hastalarının mukus yapısına kıyasla belirgin şekilde farklı viskoziteye sahip olduğu dikkate alınmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

1. Validasyonu yapılan HPLC yöntemi ile siprofloksasin, levofloksasin ve asetilsistein maddelerinin eş zamanlı kantitatif analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir. BCA yönteminin, dornaz alfa maddesinin miktar tayini için uygun bir yöntem olduğu görülmüştür.
2. Bilyalı değirmen, yüksek basınçlı homojenizasyon, püskürterek kurutuma yöntemlerinin, kullanılan maddelerin mikronizasyonu ve inhale edilebilir özellikte maddelerin üretimi için uygun olduğu görülmüştür. Üretim parametreleri değiştirilerek, KTİ'lerin partikül büyüklükleri ve partikül büyüklüğü dağılımları değiştirilebilmektedir. Üretim parametreleri değiştirilerek, KTİ'lerin partikül morfolojileri, nem içerikleri ve nem çekme özellikleri değiştirilebilmektedir. Üretim parametreleri değiştirilerek, kristal yapısındaki işlem görmemiş etkin maddelerin, kristal yapıyı koruyabilecekleri veya amorf yapıya dönüşebilecekleri görülmüştür. Pulmozyme® preparatı içerisinde dornaz alfa maddesinin yanı sıra çeşitli tuzlar ve su bulunmasının, partikül morfolojisini ve nem içeriğini etkilediği görülmüştür.
3. Mikronizasyon işleminin veya mukolitik varlığının siprofloksasinin çözünürlüğü üzerinde bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Mikronizasyon işleminin siprofloksasinin çözünme süresini kısalttığı, mukolitik varlığının çözünme süresini uzattığı gözlenmiştir.
4. Siprofloksasin ve levofloksasin antibiyotikleri ile asetilsistein ve dornaz alfa mukolitiklerinin kombine edilmesinin aerodinamik parametreleri önemli ölçüde etkilemediği görülmüştür. Çözelti formundan püskürtülerek kurutulan levofloksasinin süspansiyon formundan püskürtülerek kurutulan siprofloksasine göre daha düşük dansiteye sahip olduğu, bu nedenle aerodinamik çapının hacim çapından daha düşük olduğu ve daha iyi aerodinamik özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Üretilen tüm KTİ'lerin, inhale edilebilir ve oldukça yakın KOAÇ değerlerine (2,29-3,20 µm) sahip olduğu görülmüştür. En yüksek ince partikül fraksiyonu (14,61 mg, %85,18) (<5 µm) levofloksasin-asetilsistein içeren formülasyon ile elde edilmiştir. Bu

çalışma ile, taşıyıcı olmadan da inhale edilebilir partiküller elde etmenin mümkün olduğu gösterilmiştir.

5. Levofloksasinin, siprofloksasinden daha yüksek bir permeabiliteye sahip olduğu görülmüştür. Çözelti olarak uygulanan formülasyonlardaki antibiyotiğin daha yüksek permeabiliteye sahip olduğu gözlenmiştir. Formülasyonun sıvı ara yüzeyine kuru toz olarak uygulandığı koşullarda, mukolitik varlığının antibiyotik permeabilitesini artırdığı görülmüştür. Antibiyotik permeabilitelerindeki en yüksek değişkenlik formülasyonun hava ara yüzeyine kuru toz olarak uygulandığı koşullarda elde edilmiştir. En yüksek permeabilite, hava ara yüzeyine çözelti olarak uygulanan levofloksasin-dornaz alfa KTİ ($9,739 \cdot 10^{-6}(\text{cm/sn})$, %15,848) ile elde edilmiştir. Fiziksel karışımlar ile kıyaslandığında, formülasyon içerisindeki antibiyotiğin permeabilitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

KTİ formülasyonlarının aerodinamik ölçütleri, toz aerosolizasyonu esnasında aglomeratların başarıyla birbirlerinden ayrıldığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, belirli miktarda tozun, kapsülün ve inhaler ağızlığının içinde kaldığı gözlemlenmiştir. Formülasyona ait bu sorunları aşmak için, yumuşak aglomerat üretimi veya toz emisyon performansını iyileştirme yeteneğine sahip başka bir KTİ aygıtı kullanımı yaklaşımları denenebilir.

Yapılan permeabilite çalışmalarından elde edilen mukus tabakası, kistik fibrozis hastalığındaki viskoz, dehidrate mukus tabakasını taklit etmek için yeterli değildir. Bu sebeple, özellikle kistik fibrozis hastalığındaki mukus tabakasını taklit etmek üzere dehidrate, viskoz yapay mukus (*artificial sputum*) ile çalışmalar yapmak, formülasyonlar içindeki mukolitiklerin etkisini görmek açısından faydalı olacaktır. Yapay mukus tabakasına uygulanan formülasyonun viskoziteyi nasıl değiştirdiği incelenebilir. Yapay mukus ortamına mikroorganizma ekimi yapıp (ör. *Pseudomonas aeruginosa*), uygulanan formülasyonların mikroorganizmaları yok etme kapasitesi ve derinliği incelenebilir.

Seçilen antibiyotiklerin dozları, bir taşıyıcı eklemek için çok yüksektir ve tez kapsamında sadece etkin maddelerle aerosolizasyonun ne kadar iyileştirilebileceği

incelenmiş olmakla birlikte, formülasyona l6sin gibi bir dağılım artırıcı eklenmesi aerosolizasyon yeteneğini artırabilir.



7. KAYNAKLAR

1. Courrier HM, Butz N, Vandamme TF. Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2002;19(4-5):425-98.
2. Zhao X, Ju Y, Liu C, Li J, Huang M, Sun J ve ark. Bronchial anatomy of left lung: a study of multi-detector row CT. *Surg Radiol Anat.* 2009;31(2):85-91.
3. Fahlman A. The pressure to understand the mechanism of lung compression and its effect on lung function. *J Appl Psychol.* 2008;104(4):907-8.
4. Kohlhauf, M. Understanding clinical aerosol therapy: physiological aspects of the respiratory system and current inhalation therapy in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. Bechtold-Peters K, Luessen H, editörler. *Pulmonary Drug Delivery.* Stuttgart: Druckerei Marquart GmbH; 2007.
5. Gaughan C, Panos AL. Anatomy of the Lungs. Gabriel EA, Salerno TA, editörler. *Principles of Pulmonary Protection in Heart Surgery.* Springer Science & Business Media; 2010.
6. Trachea and bronchi structure. [İnternet]. 2013 [Erişim Tarihi 14 Şubat 2017]. Erişim adresi: https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/the-respiratory-system-39/systems-of-gas-exchange-219/mammalian-systems-and-protective-mechanisms-832-12076/images/fig-ch39_01_07/
7. Scheuch G, Zimlich WC, Siekmeier R. Biophysical parameters determining pulmonary drug delivery. Bechtold-Peters K, Luessen H, editörler. *Pulmonary drug delivery.* Stuttgart: Druckerei Marquart GmbH; 2007.
8. Taylor, K. Pulmonary drug delivery. Aulton ME, editör. *Pharmaceutics, The science of dosage form design.* İspanya: Elsevier Limited; 2002.
9. O'Donnell KP, Symth HDC. Macro- and microstructure of the airways for the drug delivery. Smyth H, Hickey A, editörler. *Controlled pulmonary drug delivery.* Londra: Springer; 2014.
10. Aerosal&aerosal drug delivery system. [İnternet]. 2014 [Erişim Tarihi 19 Şubat 2017]. Erişim adresi: <http://www.slideshare.net/AllergyChula/aerosalaerosal-drug-delivery-system>
11. Bur M, Bock U, Haltner-Ukomadu E, Lehr CM. In vitro models for pulmonary drug absorption. Bechtold-Peters K, Luessen H, editörler. *Pulmonary drug delivery.* Stuttgart: Druckerei Marquart GmbH; 2007.
12. Price D, Ackland L, Suphioglu C. Nuts 'n' guts: transport of food allergens across the intestinal epithelium. *Asia Pac Allergy.* 2013;3(4):257-65.
13. de Souza Carvalho C, Daum N, Lehr CM. Carrier interactions with the biological barriers of the lung: Advanced in vitro models and challenges for pulmonary drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;75:129-40.

14. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J*. 1999;13(5):1177-88.
15. Evora C, Soriano I, Rogers RA, Shakesheff KN, Hanes J, Langer R. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Control Release*. 1998;51(2-3):143-52.
16. Ng K, Stringer KA, Cohen Z, Serravo R, Tian B, Meyer JD ve ark. Alveolar macrophage cell line is not activated by exposure to polymeric microspheres. *Int J Pharm*. 1998;170(1):41-9.
17. Behr J. Pulmonary hypertension in lung diseases. *Dtsch Med Wochenschr*. 2008;133(6):196-8.
18. Shaw DE, Green RH, Bradding P. Asthma exacerbations: prevention is better than cure. *Ther Clin Risk Manag*. 2005;1(4):273-7.
19. Mroz RM, Noparlik J, Chyczewska E, Braszko JJ, Holownia A. Molecular basis of chronic inflammation in lung diseases: new therapeutic approach. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58(5):453-60.
20. Weiss LR. Open-label, randomized comparison of the efficacy and tolerability of clarithromycin, levofloxacin, and cefuroxime axetil in the treatment of adults with acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. *Clin Ther*. 2002;24(9):1414-25.
21. Antoniu SA, Cojocaru I. Inhaled colistin for lower respiratory tract infections. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(3):333-42.
22. World Health Organization, The global burden of disease: 2004 update [Internet]. 2008 [Erişim Tarihi 7 Nisan 2017]. Erişim adresi: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf
23. Traini D, Young PM. Delivery of antibiotics to the respiratory tract: an update. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;6(9):897-905.
24. Jones AM, Helm JM. Emerging treatments in cystic fibrosis. *Drugs*. 2009;69(14):1903-10.
25. Lay-Son G, Puga A, Astudillo P, Repetto GM, Collaborative Group of the Chilean National Cystic Fibrosis Program. Cystic fibrosis in Chilean patients: Analysis of 36 common CFTR gene mutations. *J Cyst Fibros*. 2011;10(1):66-70.
26. Yang Y, Tsifansky MD, Wu CJ, Yang HI, Schmidt G, Yeo Y. Inhalable antibiotic delivery using a dry powder co-delivering recombinant deoxyribonuclease and ciprofloxacin for treatment of cystic fibrosis. *Pharm Res*. 2010;27(1):151-60.
27. Kaiser J. New cystic fibrosis drug offers hope, at a price. *Science*. 2012;335(6069):645.

28. Mayer M. Lumacaftor-ivacaftor (Orkambi) for cystic fibrosis: behind the 'breakthrough'. *Evid Based Med.* 2016;21(3):83-6.
29. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(8):918-51.
30. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* 1996;85(2):229-36.
31. Ren CL, Konstan MW, Yegin A, Rasouliyan L, Trzaskoma B, Morgan WJ ve ark. Multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and lung function decline in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2012;11(4):293-9.
32. Tiddens HAWM, Devadason SG. Delivery of therapy to the cystic fibrosis lung. Hodson M, Geddes D, Bush A, editörler. *Cystic Fibrosis.* 3th ed. Londra: Hodder Arnold;2007.
33. Cipolla D, Chan HK. Inhaled antibiotics to treat lung infection. *Pharm Pat Anal.* 2013;2(5):647-63.
34. Buttini F, Rossi I, Di Cuia M, Rossi A, Colombo G, Elviri L ve ark. Combinations of colistin solutions and nebulisers for lung infection management in cystic fibrosis patients. *Int J Pharm.* 2016;502(1-2):242-8.
35. Balducci A G, Bettini R, Colombo P, Buttini F. Drug delivery strategies for pulmonary administration of antibiotics. Nokhodchi A, Martin GP, editörler. *Pulmonary drug delivery: advances and challenges.* Chichester: John Wiley & Sons; 2015.
36. Stass H, Weimann B, Nagelschmitz J, Rolinck-Werninghaus C, Staab D. Tolerability and pharmacokinetic properties of ciprofloxacin dry powder for inhalation in patients with cystic fibrosis: a phase I, randomized, dose-escalation study. *Clin Ther.* 2013;35(10):1571-81.
37. Geller DE, Flume PA, Staab D, Fischer R, Loutit JS, Conrad DJ ve ark. Levofloxacin inhalation solution (MP-376) in patients with cystic fibrosis with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(11):1510-6.
38. Geller DE, Flume PA, Griffith DC, Morgan E, White D, Loutit JS ve ark. Pharmacokinetics and safety of MP-376 (levofloxacin inhalation solution) in cystic fibrosis subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2636-40.
39. Azoicai D, Antoniu SA. MP-376 (Aeroquin) for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013;22(2):267-76.
40. Gaspar MC, Grégoire N, Sousa JJS, Pais AACC, Lamarche I, Gobin P ve ark. Pulmonary pharmacokinetics of levofloxacin in rats after aerosolization of immediate-release chitosan or sustained-release PLGA microspheres. *Eur J Pharm Sci.* 2016;93:184-91.

41. Dharmadhikari AS, Kabadi M, Gerety B, Hickey AJ, Fourie PB, Nardell E. Phase I, single-dose, dose-escalating study of inhaled dry powder capreomycin: a new approach to therapy of drug-resistant tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2613-9.
42. Newhouse MT, Hirst PH, Duddu SP, Walter YH, Tarara TE, Clark AR ve ark. Inhalation of a dry powder tobramycin PulmoSphere formulation in healthy volunteers. *Chest.* 2003;124(1):360-6.
43. Yapa SWS, Li J, Porter CJH, Nation RL, Patel K, McIntosh MP. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate in rats: achieving sustained lung concentrations of colistin for targeting respiratory infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(10):5087-95.
44. Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Paterson DL, Shoham S, Jacob J ve ark. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3284-94.
45. Schuster A, Haliburn C, Doring G, Goldman MH. Safety, efficacy and convenience of colistimethate sodium dry powder for inhalation (Colobreathe DPI) in patients with cystic fibrosis: a randomised study. *Thorax.* 2013;68(4):344-50.
46. Yapa SWS, Li J, Patel K, Wilson JW, Dooley MJ, George J ve ark. Pulmonary and systemic pharmacokinetics of inhaled and intravenous colistin methanesulfonate in cystic fibrosis patients: targeting advantage of inhalational administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2570-9.
47. Chernish RN, Aaron SD. Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2003;9(6):509-15.
48. Hoiby N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med.* 2011;9:32.
49. Elborn JS, Henig NR. Optimal airway antimicrobial therapy for cystic fibrosis: the role of inhaled aztreonam lysine. *Expert Opin Pharmacother.* 2010;11(8):1373-85.
50. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE ve ark. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):2946-50.
51. Woodcock J, Griffin JP, Behrman RE. Development of novel combination therapies. *N Engl J Med.* 2011;364(11):985-7.
52. Adi H, Young PM, Chan H-K, Stewart P, Agus H, Traini D. Cospray dried antibiotics for dry powder lung delivery. *J Pharm Sci.* 97(8):3356-66.

53. Lee SI, Kim HM, Kim WH. Comparison of iron status between fullterm and preterm infants: An experience in a single hospital for 2 years. *Korean J Perinatol.* 2013;24(4):275-80.
54. Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;56(6):588-99.
55. Groneberg DA, Witt C, Wagner U, Chung KF, Fischer A. Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respir Med.* 2003;97(4):382-7.
56. Brzoska M, Langer K, Coester C, Loitsch S, Wagner TO, Mallinckrodt C. Incorporation of biodegradable nanoparticles into human airway epithelium cells- in vitro study of the suitability as a vehicle for drug or gene delivery in pulmonary diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318(2):562-70.
57. Jansen M, Darby I, Abribat T, Dubreuil P, Ferdinandi ES, Hardy JG. Pulmonary delivery of TH9507, a growth hormone releasing factor analogue, in the dog. *Int J Pharm.* 2004;276(1-2):75-81.
58. Bosquillon C, Pr at V, Vanbever R. Pulmonary delivery of growth hormone using dry powders and visualization of its local fate in rats. *J Control Release.* 2004;96(2):233-44.
59. Bivas-Benita M, van Meijgaarden KE, Franken KLMC, Junginger HE, Borchard G, Ottenhoff THM et al. Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A*0201-restricted T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine.* 2004;22(13-14):1609-15.
60. Reynolds PN. Delivery of DNA to pulmonary endothelium using adenoviral vectors. *Methods Mol Biol.* 2004;246:69-89.
61. Brain JD. Inhalation, deposition, and fate of insulin and other therapeutic proteins. *Diabetes Technol Ther.* 2007;9(1):S4-S15.
62. Okamoto H, Todo H, Iida K, Danjo K. Dry powders for pulmonary delivery of peptides and proteins. *Kona.* 2002;20:71-83.
63. Johnson KA. Preparation of peptide and protein powders for inhalation. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;26(1):3-15.
64. Ruffin RE, Dolovich MB, Wolff RK, Newhouse MT. The effects of preferential deposition of histamine in the human airway. *Am Rev Respir Dis.* 1978;117(3):485-92.
65. Hussain A, Arnold JJ, Khan MA, Ahsan F. Absorption enhancers in pulmonary protein delivery. *J Control Release.* 2004;94(1):15-24.
66. Koshkina NV, AgoulNIK IY, Melton SL, Densmore CL, Knight V. Biodistribution and pharmacokinetics of aerosol and intravenously administered DNA-

- polyethyleneimine complexes: optimization of pulmonary delivery and retention. *Mol Ther.* 2003;8(2):249-54.
67. Karlowicz MG. Long-term pulmonary consequences of elective cesarean delivery. *JAMA.* 2002;288(11):1352; author reply
 68. Mozafari MR, Reed CJ, Rostron C, Kocum C, Piskin E. Formation and characterisation of non-toxic anionic liposomes for delivery of therapeutic agents to the pulmonary airways. *Cell Mol Biol Lett.* 2002;7(2):243-4.
 69. Bruck A, Abu-Dahab R, Borchard G, Schafer UF, Lehr CM. Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: interaction with human alveolar epithelial cells. *J Drug Target.* 2001;9(4):241-51.
 70. Sung JC, Pulliam BL, Edwards DA. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *Trends Biotechnol.* 2007;25(12):563-70.
 71. Emami J, Hamishehkar H, Najafabadi AR, Gilani K, Minaiyan M, Mahdavi H ve ark. Particle size design of PLGA microspheres for potential pulmonary drug delivery using response surface methodology. *J Microencapsul.* 2009;26(1):1-8.
 72. Chono S, Tanino T, Seki T, Morimoto K. Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes. *J Drug Target.* 2006;14(8):557-66.
 73. Adjei A, Garren J. Pulmonary delivery of peptide drugs: effect of particle size on bioavailability of leuprolide acetate in healthy male volunteers. *Pharm Res.* 1990;7(6):565-9.
 74. Rees PJ, Clark TJ, Moren F. The importance of particle size in response to inhaled bronchodilators. *Eur J Respir Dis Suppl.* 1982;119:73-8.
 75. Ashurst I, Malton A, Prime D, Sumbly B. Latest advances in the development of dry powder inhalers. *Pharm Sci Technolo Today.* 2000;3(7):246-56.
 76. Çelebi N. Nazal ve pulmoner sistemler. Gürsoy AZ, editör. *Kontrollü salım sistemleri.* İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayınları; 2002.
 77. Sezgi C, Özbay B, Kara M, Doğan E, İşlek A, Uzun K. Astım ve KOAH'lı hastalar için inhaler seçiminde inspiratuar akım hızının önemi. *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 2004;2(2):1-6.
 78. Boyacı H, Yücesoy L, Yıldız F, Ilgazlı A, Başığit İ. Astımlı hastalarda formoterol, salmeterol, salbutamol ve ipratropium bromürün etki başlama sürelerinin karşılaştırılması. *Solunum Hastalıkları.* 2004;15:1-7.
 79. Türkteş İ. Çocuklarda inhalasyon tedavisi. *Türk Toraks Dergisi.* 2002;3(0):32-4.
 80. Köse S, Karaman Ö, Uzuner N, Ellidokuz H, Turgut CŞ, Tezcan D. Bronşiyal astımlı çocuklarda formoterol kullanımının klinik etkileri. *Toraks Dergisi.* 2003;4(2):168-72.

81. Cleveland Clinic, Home nebulizer therapy [İnternet]. 2016 [Erişim Tarihi 14 Şubat 2017]. Erişim adresi: <http://my.clevelandclinic.org/health/articles/home-nebulizer-therapy>
82. Frijlink HW, de Boer AH. Nebulization and administration devices. Bechtold-Peters K, Luessen H, editörler. Pulmonary drug delivery. Stuttgart: Druckerei Marquart GmbH; 2007.
83. O'Callaghan C, Barry PW. The science of nebulised drug delivery. *Thorax*. 1997;52(2):S31-44.
84. Le Brun PP, de Boer AH, Gjaltema D, Hagedoorn P, Heijerman HG, Frijlink HW. Inhalation of tobramycin in cystic fibrosis. Part 2: optimization of the tobramycin solution for a jet and an ultrasonic nebulizer. *Int J Pharm*. 1999;189(2):215-25.
85. Flament MP, Leterme P, Gayot A. Influence of the technological parameters of ultrasonic nebulisation on the nebulisation quality of alpha1 protease inhibitor (alpha1PI). *Int J Pharm*. 1999;189(2):197-204.
86. Hess DR. Metered-dose inhalers and dry powder inhalers in aerosol therapy. *Respir Care*. 2005;50(10):1376-83.
87. Metered dose inhaler filling machine MDI [İnternet] 2017 [Erişim Tarihi 14 Şubat 2017] Erişim adresi: <http://www.fillingmachinesmanufacturer.com/metered-dose-inhaler-filling-machine.html>
88. Blau H, Mussaffi H, Mei Zahav M, Prais D, Livne M, Czitron BM ve ark. Microbial contamination of nebulizers in the home treatment of cystic fibrosis. *Child Care Health Dev*. 2007;33(4):491-5.
89. Cohen HA, Cohen Z, Pomeranz AS, Czitron B, Kahan E. Bacterial contamination of spacer devices used by asthmatic children. *J Asthma*. 2005;42(3):169-72.
90. de Vries TW, Rienstra SR, van der Vorm ER. Bacterial contamination of inhalation chambers: results of a pilot study. *J Aerosol Med*. 2004;17(4):354-6.
91. Cipolla D, Chan HK, Schuster J, Farina D. Personalizing aerosol medicine: development of delivery systems tailored to the individual. *Ther Deliv*. 2010;1(5):667-82.
92. Geller DE, Konstan MW, Smith J, Noonberg SB, Conrad C. Novel tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis subjects: pharmacokinetics and safety. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(4):307-13.
93. Konstan MW, Flume PA, Kappler M, Chiron R, Higgins M, Brockhaus F ve ark. Safety, efficacy and convenience of tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis patients: The EAGER trial. *J Cyst Fibros*. 2011;10(1):54-61.
94. Smith IJ, Parry-Billings M. The inhalers of the future? A review of dry powder devices on the market today. *Pulm Pharmacol Ther*. 2003;16(2):79-95.

95. Telko MJ, Hickey AJ. Dry powder inhaler formulation. *Respir Care*. 2005;50(9):1209-27.
96. Coates MS, Chan HK, Fletcher DF, Raper JA. Influence of air flow on the performance of a dry powder inhaler using computational and experimental analyses. *Pharm Res*. 2005;22(9):1445-53.
97. Son YJ, McConville JT. A new respirable form of rifampicin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;78(3):366-76.
98. Srichana T, Martin GP, Marriott C. Dry powder inhalers: the influence of device resistance and powder formulation on drug and lactose deposition in vitro. *Eur J Pharm Sci*. 1998;7(1):73-80.
99. Lavorini F. The challenge of delivering therapeutic aerosols to asthma patients. *ISRN Allergy*. 2013;2013:102418.
100. Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları Ve Cerrahisi. Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Eğitim Koordinatörlüğü - PDF [İnternet]. 2017 [Erişim Tarihi 20 Mart 2017]. Erişim adresi: <http://docplayer.biz.tr/7274598-Dr-suat-seren-gogus-hastaliklari-ve-cerrahisi-egitim-ve-arastirma-hastanesi-egitim-koordinatordlugu.html>
101. Quality solutions for inhaler testing [İnternet]. 2017 [Erişim Tarihi 14 Mart 2017]. Erişim adresi: http://www.copleyscientific.com/files/ww/brochures/Inhaler%20Testing%20Brochure%202015_Rev4_Low%20Res.pdf.
102. Taylor K. Pulmonary drug delivery. Aulton ME, editör. *Pharmaceutics, the science of dosage form design*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002.
103. Marek SR, Donovan MJ, Smyth HD. Effects of mild processing pressures on the performance of dry powder inhaler formulations for inhalation therapy. 1: Budesonide and lactose. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;78(1):97-106.
104. Zhou QT, Morton DA. Drug-lactose binding aspects in adhesive mixtures: controlling performance in dry powder inhaler formulations by altering lactose carrier surfaces. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(3):275-84.
105. Kaialy W, Martin GP, Larhrib H, Ticehurst MD, Kolosionek E, Nokhodchi A. The influence of physical properties and morphology of crystallised lactose on delivery of salbutamol sulphate from dry powder inhalers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;89:29-39.
106. Donovan MJ, Smyth HD. Influence of size and surface roughness of large lactose carrier particles in dry powder inhaler formulations. *Int J Pharm*. 2010;402(1-2):1-9.
107. Steckel H, Bolzen N. Alternative sugars as potential carriers for dry powder inhalations. *Int J Pharm*. 2004;270(1-2):297-306.
108. Zhou QT, Qu L, Larson I, Stewart PJ, Morton DA. Improving aerosolization of drug powders by reducing powder intrinsic cohesion via a mechanical dry coating approach. *Int J Pharm*. 2010;394(1-2):50-9.

109. Zhou QT, Qu L, Gengenbach T, Larson I, Stewart PJ, Morton DA. Effect of surface coating with magnesium stearate via mechanical dry powder coating approach on the aerosol performance of micronized drug powders from dry powder inhalers. *AAPS PharmSciTech*. 2013;14(1):38-44.
110. Zhou QT, Denman JA, Gengenbach T, Das S, Qu L, Zhang H ve ark. Characterization of the surface properties of a model pharmaceutical fine powder modified with a pharmaceutical lubricant to improve flow via a mechanical dry coating approach. *J Pharm Sci*. 2011;100(8):3421-30.
111. Zhou QT, Armstrong B, Larson I, Stewart PJ, Morton DA. Understanding the influence of powder flowability, fluidization and de-agglomeration characteristics on the aerosolization of pharmaceutical model powders. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40(5):412-21.
112. Parlati C, Colombo P, Buttini F, Young PM, Adi H, Ammit AJ ve ark. Pulmonary spray dried powders of tobramycin containing sodium stearate to improve aerosolization efficiency. *Pharm Res*. 2009;26(5):1084-92.
113. Belotti S, Rossi A, Colombo P, Bettini R, Rekkas D, Politis S ve ark. Spray dried amikacin powder for inhalation in cystic fibrosis patients: a quality by design approach for product construction. *Int J Pharm*. 2014;471(1-2):507-15.
114. Sou T, Kaminskas LM, Nguyen TH, Carlberg R, McIntosh MP, Morton DA. The effect of amino acid excipients on morphology and solid-state properties of multi-component spray-dried formulations for pulmonary delivery of biomacromolecules. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;83(2):234-43.
115. Sou T, Orlando L, McIntosh MP, Kaminskas LM, Morton DA. Investigating the interactions of amino acid components on a mannitol-based spray-dried powder formulation for pulmonary delivery: A design of experiment approach. *Int J Pharm*. 2011;421(2):220-9.
116. Hoe S, Ivey JW, Boraey MA, Shamsaddini-Shahrbabak A, Javaheri E, Matinkhoo S ve ark. Use of a fundamental approach to spray-drying formulation design to facilitate the development of multi-component dry powder aerosols for respiratory drug delivery. *Pharm Res*. 2014;31(2):449-65.
117. Paajanen M, Katainen J, Raula J, Kauppinen EI, Lahtinen J. Direct evidence on reduced adhesion of Salbutamol sulphate particles due to L-leucine coating. *Powder Technol*. 2009;192(1):6-11.
118. Raula J, Thielmann F, Naderi M, Lehto V-P, Kauppinen EI. Investigations on particle surface characteristics vs. dispersion behaviour of l-leucine coated carrier-free inhalable powders. *Int J Pharm*. 2010;385(1-2):79-85.
119. Elhissi AMA, Taylor KMG. Delivery of liposomes generated from proliposomes using air-jet, ultrasonic, and vibrating-mesh nebulisers. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2005;15(4):261-5.

120. Song K-H, Chung S-J, Shim C-K. Preparation and evaluation of proliposomes containing salmon calcitonin. *J Control Release*. 2002;84(1–2):27-37.
121. Rojanarat W, Changsan N, Tawithong E, Pinsuwan S, Chan H-K, Srichana T. Isoniazid proliposome powders for inhalation: preparation, characterization and cell culture studies. *Int J Mol Sci*. 2011;12(7):4414.
122. Patil-Gadhe A, Pokharkar V. Single step spray drying method to develop proliposomes for inhalation: a systematic study based on quality by design approach. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014;27(2):197-207.
123. Salama RO, Traini D, Chan H-K, Sung A, Ammit AJ, Young PM. Preparation and evaluation of controlled release microparticles for respiratory protein therapy. *J Pharm Sci*. 2009;98(8):2709-17.
124. Roberts RA, Shen T, Allen IC, Hasan W, DeSimone JM, Ting JP. Analysis of the murine immune response to pulmonary delivery of precisely fabricated nano- and microscale particles. *PLoS one*. 2013;8(4):e62115.
125. Dailey LA, Jekel N, Fink L, Gessler T, Schmehl T, Wittmar M ve ark. Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;215(1):100-8.
126. Tomashefski JF, Cohen AM, Doershuk CF. Longterm histopathologic follow-up of bronchial arteries after therapeutic embolization with polyvinyl alcohol (Ivalon) in patients with cystic fibrosis. *Hum Pathol*. 1988;19(5):555-61.
127. Cheow WS, Chang MW, Hadinoto K. Antibacterial efficacy of inhalable levofloxacin-loaded polymeric nanoparticles against e. coli biofilm cells: the effect of antibiotic release profile. *Pharm Res*. 2010;27(8):1597-609.
128. Cheow WS, Chang MW, Hadinoto K. The roles of lipid in anti-biofilm efficacy of lipid–polymer hybrid nanoparticles encapsulating antibiotics. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2011;389(1–3):158-65.
129. Ungaro F, d'Angelo I, Coletta C, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Perfetto B ve ark. Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers. *J Control Release*. 2012;157(1):149-59.
130. Son YJ, McConville JT. Preparation of sustained release rifampicin microparticles for inhalation. *J Pharm Pharmacol*. 2012;64(9):1291-302.
131. Doan TVP, Olivier JC. Preparation of rifampicin-loaded PLGA microspheres for lung delivery as aerosol by premix membrane homogenization. *Int J Pharm*. 2009;382(1–2):61-6.
132. Manca ML, Loy G, Zaru M, Fadda AM, Antimisiaris SG. Release of rifampicin from chitosan, PLGA and chitosan-coated PLGA microparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;67(2):166-70.

133. Doan TVP, Couet W, Olivier JC. Formulation and in vitro characterization of inhalable rifampicin-loaded PLGA microspheres for sustained lung delivery. *Int J Pharm.* 2011;414(1–2):112-7.
134. Diab R, Brillault J, Bardy A, Gontijo AVL, Olivier JC. Formulation and in vitro characterization of inhalable polyvinyl alcohol-free rifampicin-loaded PLGA microspheres prepared with sucrose palmitate as stabilizer: efficiency for ex vivo alveolar macrophage targeting. *Int J Pharm.* 2012;436(1–2):833-9.
135. Budhian A, Siegel SJ, Winey KI. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *Int J Pharm.* 2007;336(2):367-75.
136. Sham JO, Zhang Y, Finlay WH, Roa WH, Lobenberg R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. *Int J Pharm.* 2004;269(2):457-67.
137. Wang Y, Kho K, Cheow WS, Hadinoto K. A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2012;424(1–2):98-106.
138. Yamasaki K, Kwok PCL, Fukushige K, Prud'homme RK, Chan H-K. Enhanced dissolution of inhalable cyclosporine nano-matrix particles with mannitol as matrix former. *Int J Pharm.* 2011;420(1):34-42.
139. Tsapis N, Bennett D, Jackson B, Weitz DA, Edwards DA. Trojan particles: large porous carriers of nanoparticles for drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12001-5.
140. D'Addio SM, Chan JGY, Kwok PCL, Benson BR, Prud'homme RK, Chan H-K. Aerosol delivery of nanoparticles in uniform mannitol carriers formulated by ultrasonic spray freeze drying. *Pharm Res.* 2013;30(11):2891-901.
141. Cheow WS, Ng MLL, Kho K, Hadinoto K. Spray-freeze-drying production of thermally sensitive polymeric nanoparticle aggregates for inhaled drug delivery: effect of freeze-drying adjuvants. *Int J Pharm.* 2011;404(1–2):289-300.
142. Valero J, Egea MA, Espina M, Gamisans F, Garcia ML. Effect of polymerization coadjuvants on nanocapsule elaboration and triamcinolone entrapment. *Drug Dev Ind Pharm.* 1996;22(2):167-73.
143. Zhang J, Wu L, Chan H-K, Watanabe W. Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):441-55.
144. Feng S-S, Mu L, Chen B-H, Pack D. Polymeric nanospheres fabricated with natural emulsifiers for clinical administration of an anticancer drug paclitaxel (Taxol®). *Mater Sci Eng C.* 2002;20(1–2):85-92.
145. Varshosaz J, Ghaffari S, Khoshayand MR, Atyabi F, Azarmi S, Kobarfard F. Development and optimization of solid lipid nanoparticles of amikacin by central composite design. *J Liposome Res.* 2010;20(2):97-104.

146. Varshosaz J, Ghaffari S, Khoshayand MR, Atyabi F, Dehkordi AJ, Kobarfard F. Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid nanoparticles using D-optimal experimental design. *Pharm Dev Technol.* 2012;17(2):187-94.
147. Ghaffari S, Varshosaz J, Saadat A, Atyabi F. Stability and antimicrobial effect of amikacin-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2010;6:35-43.
148. Karaiskos I, Friberg LE, Pontikis K, Ioannidis K, Tsagkari V, Galani L ve ark. Colistin population pharmacokinetics after application of a loading dose of 9 MU colistin methanesulfonate in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(12):7240-8.
149. El-Gendy N, Desai V, Berkland C. Agglomerates of ciprofloxacin nanoparticles yield fine dry powder aerosols. *J Pharm Innov.* 2010;5(3):79-87.
150. Pilcer G, Vanderbist F, Amighi K. Preparation and characterization of spray-dried tobramycin powders containing nanoparticles for pulmonary delivery. *Int J Pharm.* 2009;365(1-2):162-9.
151. Savara Inc., Savara Pharmaceuticals' AeroVanc granted U.S. orphan drug designation for the treatment of MRSA lung infection in cystic fibrosis patients [Internet]. 2012 [Erişim Tarihi 10 Mart 2017]. Erişim adresi: <http://savarapharma.com/savara-pharmaceuticals-aerovanc-granted-u-s-orphan-drug-designation-treatment-mrsa-lung-infection-cystic-fibrosis-patients/>
152. Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50(1):161-77.
153. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(7):645-66.
154. Duchene D, Wouessidjewe D, Ponchel G. Cyclodextrins and carrier systems. *J Control Release.* 1999;62(1-2):263-8.
155. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm.* 2010;392(1-2):1-19.
156. Weers JG, Bell J, Chan HK, Cipolla D, Dunbar C, Hickey AJ ve ark. Pulmonary formulations: what remains to be done? *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2010;23(2):5-23.
157. Burke PA. Controlled release protein therapeutics: effects of process and formulation on stability. Wise DL, editör. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology.* New York: Marcel Dekker;2000.
158. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.* 2000;21(23):2475-90.
159. Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release.* 2005;102(2):313-32.

160. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release*. 2008;125(3):193-209.
161. Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H ve ark. Pharmaceutical particle technologies: an approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian J Pharm Sci*. 2014;9(6):304-16.
162. Castelli F, Conti B, Conte U, Puglisi G. Effect of molecular weight and storage times on tolmetin release from poly-d,l-lactide microspheres to lipid model membrane: a calorimetric study. *J Control Release*. 1996;40(3):277-84.
163. Dickinson PA, Kellaway IW, Taylor G, Mohr D, Nagels K, Wolff H-M. In vitro and in vivo release of estradiol from an intra-muscular microsphere formulation. *Int J Pharm*. 1997;148(1):55-61.
164. Russo P, Sacchetti C, Pasquali I, Bettini R, Massimo G, Colombo P ve ark. Primary microparticles and agglomerates of morphine for nasal insufflation. *J Pharm Sci*. 2006;95(12):2553-61.
165. Li HY, Seville PC, Williamson IJ, Birchall JC. The use of amino acids to enhance the aerosolisation of spray-dried powders for pulmonary gene therapy. *J Gene Med*. 2005;7(3):343-53.
166. Li HY, Neill H, Innocent R, Seville P, Williamson I, Birchall JC. Enhanced dispersibility and deposition of spray-dried powders for pulmonary gene therapy. *J Drug Target*. 2003;11(7):425-32.
167. Ely L, Roa W, Finlay WH, Lobenberg R. Effervescent dry powder for respiratory drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;65(3):346-53.
168. Chan HK, Clark A, Gonda I, Mumenthaler M, Hsu C. Spray dried powders and powder blends of recombinant human deoxyribonuclease (rhDNase) for aerosol delivery. *Pharm Res*. 1997;14(4):431-7.
169. Corrigan DO, Healy AM, Corrigan OI. The effect of spray drying solutions of polyethylene glycol (PEG) and lactose/PEG on their physicochemical properties. *Int J Pharm*. 2002;235(1-2):193-205.
170. Mosen K, Backstrom K, Thalberg K, Schaefer T, Axelsson A, Kristensen HG. The apparent plasticizing effect of polyethylene glycol (PEG) on the crystallinity of spray dried lactose/PEG composites. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;64(2):206-11.
171. Louey MD, Van Oort M, Hickey AJ. Aerosol dispersion of respirable particles in narrow size distributions using drug-alone and lactose-blend formulations. *Pharm Res*. 2004;21(7):1207-13.
172. Hadinoto K, Phanapavudhikul P, Kewu Z, Tan RB. Dry powder aerosol delivery of large hollow nanoparticulate aggregates as prospective carriers of

- nanoparticulate drugs: effects of phospholipids. *Int J Pharm.* 2007;333(1-2):187-98.
173. Buchi B-290 Mini spray dryer [İnternet]. 2017 [Erişim Tarihi 15 Şubat 2017]. Erişim adresi: <https://industrialscience.invitro.com.au/products/s/BU44699/Buchi-B290-Mini-spray-dryer/>
174. Edwards DA, Hanes J, Caponetti G, Hrkach J, Ben-Jebria A, Eskew ML ve ark. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science.* 1997;276(5320):1868-71.
175. Brannon-Peppas L, Vert M. Polylactic and polyglycolic acids as drug delivery carriers. Wise DL, editör. *Handbook of pharmaceutical controlled release technology.* New York: Marcel Dekker; 2000.
176. Takada S, Uda Y, Toguchi H, Ogawa Y. Application of a spray drying technique in the production of TRH-containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers. *PDA J Pharm Sci Technol.* 1995;49(4):180-4.
177. Johnson OL, Jaworowicz W, Cleland JL, Bailey L, Charnis M, Duenas E ve ark. The stabilization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres. *Pharm Res.* 1997;14(6):730-5.
178. Columbano A, Buckton G, Wikeley P. A study of the crystallisation of amorphous salbutamol sulphate using water vapour sorption and near infrared spectroscopy. *Int J Pharm.* 2002;237(1-2):171-8.
179. Grisedale LC, Jamieson MJ, Belton PS, Barker SA, Craig DQ. Characterization and quantification of amorphous material in milled and spray-dried salbutamol sulfate: a comparison of thermal, spectroscopic, and water vapor sorption approaches. *J Pharm Sci.* 2011;100(8):3114-29.
180. Gaisford S. Isothermal microcalorimetry for quantifying amorphous content in processed pharmaceuticals. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(5):431-9.
181. Adi H, Young PM, Chan H-K, Agus H, Traini D. Co-spray-dried mannitol-ciprofloxacin dry powder inhaler formulation for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Pharm Sci.* 2010;40(3):239-47.
182. Zhou QT, Morton DA, Yu HH, Jacob J, Wang J, Li J ve ark. Colistin powders with high aerosolisation efficiency for respiratory infection: preparation and in vitro evaluation. *J Pharm Sci.* 2013;102(10):3736-47.
183. Morton DAV, Jong T, Li J, Hale JD, Nation RL, Larson I. Investigating the particle engineering of colistin for pulmonary delivery. *RDD Europe 2011.* 2011;2:367-372.
184. Zhou QT, Gengenbach T, Denman JA, Yu HH, Li J, Chan HK. Synergistic antibiotic combination powders of colistin and rifampicin provide high aerosolization efficiency and moisture protection. *AAPS J.* 2014;16(1):37-47.

185. Tsapis N, Bennett D, O'Driscoll K, Shea K, Lipp MM, Fu K ve ark. Direct lung delivery of para-aminosalicylic acid by aerosol particles. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(6):379-85.
186. Gad S, Tajber L, Corrigan OI, Healy AM. Preparation and characterisation of novel spray-dried nano-structured para-aminosalicylic acid particulates for pulmonary delivery: impact of ammonium carbonate on morphology, chemical composition and solid state. *J Pharm Pharmacol*. 2012;64(9):1264-74.
187. Chan JG, Duke CC, Ong HX, Chan JC, Tyne AS, Chan HK ve ark. A novel inhalable form of rifapentine. *J Pharm Sci*. 2014;103(5):1411-21.
188. Tiddens HA, Geller DE, Challoner P, Speirs RJ, Kesser KC, Overbeek SE ve ark. Effect of dry powder inhaler resistance on the inspiratory flow rates and volumes of cystic fibrosis patients of six years and older. *J Aerosol Med*. 2006;19(4):456-65.
189. Son Y-J, Mitchell JP, McConville JT. In vitro performance testing for pulmonary drug delivery. Smyth HDC, Hickey AJ, editörler. *Controlled pulmonary drug delivery*. New York: Springer; 2011.
190. Preparations for inhalation: aerodynamic assessment of fine particles (European Pharmacopoeia 5.1) [İnternet]. 2005 [Erişim Tarihi 10 Mart 2017] Erişim adresi: http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP501E/02_methods_of_analysis/2.9.____p_harmaceutical_technical_procedures/2.9.18.%20Preparations%20for%20inhalation%20%20aerodynamic%20assessment%20of%20fine%20particles/2.9.18.pdf
191. USP Pharmacopoeial Forum. 2002;28(2):601-603.
192. Thorat S, Meshram S. Formulation and product development of pressurised metered dose inhaler: an overview. [İnternet]. 2017 [Erişim Tarihi 14 Şubat 2017]. Erişim adresi: <http://www.pharmatutor.org/articles/formulation-product-development-pressurised-metered-dose-inhaler-overview?page=2%2C1>
193. Buckley ST, Kim K-J, Ehrhardt C. In vitro cell culture models for evaluating controlled release pulmonary drug delivery. Smyth HDC, Hickey AJ, editörler. *Controlled pulmonary drug delivery*. New York: Springer; 2011.
194. Borchard G, Cassara ML, Roemele PE, Florea BI, Junginger HE. Transport and local metabolism of budesonide and fluticasone propionate in a human bronchial epithelial cell line (Calu-3). *J Pharm Sci*. 2002;91(6):1561-7.
195. Grainger CI, Greenwell LL, Martin GP, Forbes B. The permeability of large molecular weight solutes following particle delivery to air-interfaced cells that model the respiratory mucosa. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(2):318-24.
196. Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res*. 2006;23(7):1482-90.

197. Ong HX, Traini D, Bebawy M, Young PM. Ciprofloxacin is actively transported across bronchial lung epithelial cells using a Calu-3 air interface cell model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2535-40.
198. Bur M, Rothen-Rutishauser B, Huwer H, Lehr CM. A novel cell compatible impingement system to study in vitro drug absorption from dry powder aerosol formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;72(2):350-7.
199. Cavet ME, West M, Simmons NL. Transepithelial transport of the fluoroquinolone ciprofloxacin by human airway epithelial Calu-3 cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(12):2693-8.
200. Ciprofloxacin hydrochloride monohydrate [İnternet], [Erişim Tarihi 03 Ocak 2017]. Erişim adresi: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/91033?lang=en®ion=TR>
201. Ciprofloxacin Hydrochloride. Sweetman SC, editör. Martindale: the complete drug reference, 36th ed. Londra: Pharmaceutical Press; 2009.
202. O'Donnell JA, Gelone SP. Fluoroquinolones. *Infect Dis Clin North Am.* 2000;14(2):489-513.
203. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician.* 2002;65(3):455-64.
204. Walker RC. The fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings.* 1999;74(10):1030-7.
205. Webster A, Gaya H. Quinolones in the treatment of serious infections. *Rev Infect Dis.* 1988;10(1):S225-33.
206. Brillault J, De Castro WV, Couet W. Relative contributions of active mediated transport and passive diffusion of fluoroquinolones with various lipophilicities in a Calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):543-5.
207. Zhanel GG, Fontaine S, Adam H, Schurek K, Mayer M, Noreddin AM ve ark. A review of new fluoroquinolones: focus on their use in respiratory tract infections. *Treat Respir Med.* 2006;5(6):437-65.
208. Benet LZ, Broccatelli F, Oprea TI. BDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS J.* 2011;13(4):519-47.
209. Olivera ME, Manzo RH, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S ve ark. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ciprofloxacin hydrochloride. *J Pharm Sci.* 2011;100(1):22-33.
210. Siprofloksasin (Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products) [İnternet]. [Erişim Tarihi 13 Mart 2017]. Erişim adresi: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process>.

211. Levofloxacin Hemihydrate [İnternet], [Erişim Tarihi 10 Ocak 2017]. Erişim adresi: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/phr1697?lang=en®ion=TR>
212. Shahwal VK, Dubey BK, Bhoumick M. Preformulation study of levofloxacin. *International Journal of Advances in Pharmaceutics*. 2012;1(1):1-8.
213. Levaquin® [İnternet]. [Erişim Tarihi 12 Ocak 2017]. Erişim adresi: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021721s020_020635s57_020634s52_1bl.pdf
214. Croom KF, Goa KL. Levofloxacin: a review of its use in the treatment of bacterial infections in the United States. *Drugs*. 2003;63(24):2769-802.
215. Hurst M, Lamb HM, Scott LJ, Figgitt DP. Levofloxacin: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs*. 2002;62(14):2127-67.
216. Sarısaltık D, Teksin ZŞ. Bioavailability file: levofloxacin. *FABAD J Pharm Sci*. 2007;32:197-208.
217. N-Acetyl-L-cysteine PharmaGrade, Ajinomoto, Manufactured under appropriate GMP controls for pharma or biopharmaceutical production, suitable for cell culture | Sigma-Aldrich [İnternet]. [Erişim Tarihi 13 Ocak 2017]. Erişim adresi: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a5099?lang=en®ion=TR&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold10-2
218. Acetylcysteine. Sweetman SC, editör. *Martindale: the complete drug reference*, 36th ed. Londra: Pharmaceutical Press; 2009.
219. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev*. 1998;3(2):114-27.
220. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer Suppl*. 1999;80(6):827-41.
221. De Flora S, Rossi GA, De Flora A. Metabolic, desmutagenic and anticarcinogenic effects of N-acetylcysteine. *Respiration*. 1986;50(1):43-9.
222. Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol*. 1997;38:205-27.
223. Albin A, Morini M, D'Agostini F, Ferrari N, Campelli F, Arena G ve ark. Inhibition of angiogenesis-driven Kaposi's sarcoma tumor growth in nude mice by oral N-acetylcysteine. *Cancer Res*. 2001;61(22):8171-8.
224. James LP, McCullough SS, Lamps LW, Hinson JA. Effect of N-acetylcysteine on acetaminophen toxicity in mice: relationship to reactive nitrogen and cytokine formation. *Toxicol Sci*. 2003;75(2):458-67.
225. Dornase Alfa. Sweetman SC, editör. *Martindale: the complete drug reference*, 36th ed. Londra: Pharmaceutical Press; 2009.

226. Quan JM, Tiddens HAWM, Sy JP, McKenzie SG, Montgomery MD, Robinson PJ ve ark. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr*. 2001;139(6):813-20.
227. Jones AP, Wallis C. Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(3):CD001127.
228. McCoy K, Hamilton S, Johnson C. Effects of 12-week administration of dornase alfa in patients with advanced cystic fibrosis lung disease. *Chest*. 1996;110(4):889-95.
229. Bryson HM, Sorkin EM. Dornase alfa: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in cystic fibrosis. *Drugs*. 1994;48(6):894-906.
230. 1-Cyclopropyl-6,7-difluoro-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic [İnternet]. [Erişim Tarihi 24 Kasım 2016]. Erişim adresi: http://www.chemsrc.com/en/cas/93107-30-3_332179.html
231. Levofloksasin [İnternet]. [Erişim Tarihi 24 Kasım 2016]. Erişim adresi: <http://www.chemnet.com/Suppliers/33973/Levofloxacin--1114803.html>
232. N-Acetyl-L-cysteine [İnternet]. [Erişim Tarihi 25 Kasım 2016]. Erişim adresi: <https://www.scbt.com/scbt/product/n-acetyl-l-cysteine-616-91-1?requestFrom=search>
233. İzopropanol [İnternet]. [Erişim Tarihi 25 Kasım 2016]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/isopropanol#section=Spectral-Properties>
234. Guidance for industry: Validation of analytical procedures: methodology final guidance, food and drug (Administration Center for Veterinary Medicine) 1999 [İnternet]. [Erişim Tarihi 16 Şubat 2017]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM052379.pdf>
235. Niopas I, Daftsios AC. Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2003;32(6):1213-8.
236. Klingler C, Muller BW, Steckel H. Insulin-micro- and nanoparticles for pulmonary delivery. *Int J Pharm*. 2009;377(1-2):173-9.
237. Son YJ, Worth Longest P, Hindle M. Aerosolization characteristics of dry powder inhaler formulations for the excipient enhanced growth (EEG) application: effect of spray drying process conditions on aerosol performance. *Int J Pharm*. 2013;443(1-2):137-45.

238. Zupancic M, Arcon I, Bukovec P, Kodre A. A physico-chemical study of the interaction of cobalt(II) ion with ciprofloxacin. *Croatica Chemica Acta*. 2002;75(1):1-12.
239. Garland AL, Walton WG, Coakley RD, Tan CD, Gilmore RC, Hobbs CA ve ark. Molecular basis for pH-dependent mucosal dehydration in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(40):15973-8.
240. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO ve ark. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*. 2012;487(7405):109-13.
241. Son YJ, Horng M, Copley M, McConville JT. Optimization of an in vitro dissolution test method for inhalation formulations. *Dissolut Technol*. 2010;6(4):6-13.
242. Stass H, Baumann-Noss S, Delesen H, Nagelschmitz J, Willmann S, Edginton A. Ciprofloxacin pulmosphere i021nhalation powder: a healthy volunteer study. [İnternet]. 2008 [Erişim Tarihi 19 Şubat 2017]. Erişim adresi: <http://www.systems-biology.com/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=3112&token=0e066aa2bbf2ce7a73f2594082e2c4282ce03310>
243. Bensikaddour H, Snoussi K, Lins L, Van Bambeke F, Tulkens PM, Brasseur R ve ark. Interactions of ciprofloxacin with DPPC and DPPG: fluorescence anisotropy, ATR-FTIR and 31P NMR spectroscopies and conformational analysis. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(11):2535-43.
244. Levofloksasin [İnternet]. [Erişim Tarihi 25 Kasım 2016]. Erişim Adresi: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008021721s020_020635s57_020634s52_ibl.pdf
245. Langenbucher F. Letters to the editor: linearization of dissolution rate curves by the weibull distribution. *J Pharm Pharmacol*. 1972;24(12):979-81.
246. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. 1987;47(4):936-42.
247. Foster KA, Avery ML, Yazdanian M, Audus KL. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *Int J Pharm*. 2000;208(1-2):1-11.
248. Tewes F, Paluch KJ, Tajber L, Gulati K, Kalantri D, Ehrhardt C ve ark. Steroid/mucokinetic hybrid nanoporous microparticles for pulmonary drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85(3): 604-613.
249. Sahoo S, Chakraborti CK, Mishra SC, Nanda UN, Naik S. FTIR and XRD investigations of some fluoroquinolones. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(3):165-70.

250. Bhardwaj V, Bhardwaj T, Sharma K, Gupta A, Chauhan S, Cameotra SS ve ark. Drug-surfactant interaction: thermo-acoustic investigation of sodium dodecyl sulfate and antimicrobial drug (levofloxacin) for potential pharmaceutical application. *RSC Adv.* 2014;4(47):24935-43.
251. Asetilsistein (Infrared reference spectra)[İnternet]. 2015 [Erişim Tarihi 19 Kasım 2016]. Erişim adresi: http://ss.pmda.go.jp/en_all/muv_ajax.x?u=http%3A%2F%2Fwww.pmda.go.jp%2Ffiles%2F000152482.pdf%23page%3D3&p=3&t=untitled&q=acetylcysteine&s=pF3fyfywmCsqztmXnli3DBBwzyJvaeP-3NRnOI7tdNESUBPUMP1Od-2SPxc1wnSjSIZf5FhtuhnottCCuSFdDe7EB0KxSmNdQtDnFkzwLHX40YxdzvH2Md--Oldh1Xkk4uImM6zCd96E0CtOBHxBFIIdKRizArg0Ai_X3xtqfoeo.&lang=en. 2015;30.04.2015
252. Kumar SS, Nangia A. A new conformational polymorph of N-acetyl-L-cysteine. The role of S–H[cdots, three dots, centered]O and C–H[cdots, three dots, centered]O interactions. *CrystEngComm.* 2013;15:6498-505.
253. Biotechnology SC. Technical Information [İnternet]. 2015 [Erişim Tarihi: 10 Mart 2016]. Erişim adresi: <http://www.scbt.com/datasheet-29064-ciprofloxacin-hcl.html>. 2015;30.04.2015.
254. Biotechnology SC. Technical Information. [İnternet]. 2015 [Erişim Tarihi: 10 Mart 2016]. Erişim adresi: <http://www.scbt.com/datasheet-202232-n-acetyl-l-cysteine.html>. 2015;30.04.2015.
255. Shahwal VK, Dubey BK, Bhoumick M. Preformulation study of levofloxacin. *International Journal of Advances in Pharmaceutics.* 2012;1(1):1-8.
256. Sahoo SCC, Naik S, Mishra SC, Nanda UN. Structural analysis of ciprofloxacin-carbopol polymeric composites by x-ray diffraction and fourier transform infrared spectroscopy. *Trop J Pharm Res.* 2011;10(3):273-80.
257. Sahoo S, Chakraborti CK, Mishra SC. Qualitative analysis of controlled release ciprofloxacin/carbopol 934 mucoadhesive suspension. *J Adv Pharm Technol Res.* 2011;2(3):195-204.
258. Pawar Ashish Y. DV. Development of cost effective biodegradable implants of ciprofloxacin hydrochloride in treatment of osteomyelitis. *J Pharm Innov.* 2012;2(5):19-37.
259. Sharma T, Kumar P, Bose P, Kumar Y. Pure levofloxacin hemihydrate and processes for preparation thereof. (Google Patents) [İnternet]. 2006 [Erişim Tarihi 10 Mart 2016]. Erişim adresi: <https://www.google.com/patents/WO2004055025A1>
260. Desai KG, Mallery SR, Schwendeman SP. Formulation and characterization of injectable poly(DL-lactide-co-glycolide) implants loaded with N-acetylcysteine, a MMP inhibitor. *Pharm Res.* 2008;25(3):586-97.

261. Cazedey ECL, Salgado HRN. Spectrophotometric determination of ciprofloxacin hydrochloride in ophthalmic solution. *Advances in Analytical Chemistry*. 2012;2(6):74-9.
262. Avhad M, Bonde CG. Development and validation of simultaneous UV spectrophotometric method for the determination of levofloxacin and ambroxol in tablets. *Int J Chemtech Res*. 2009;1(4):873-88.
263. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. (2017). Acetylcysteine. [Internet]. [Erişim Tarihi 27 Şubat 2017] Erişim adresi: <http://xiuzhengrd.com/clark/current/clk0025.htm>
264. Kumar G, Sharma S, Shafiq N, Khuller GK, Malhotra S. Optimization, in vitro–in vivo evaluation, and short-term tolerability of novel levofloxacin-loaded PLGA nanoparticle formulation. *J Pharm Sci*. 2012;101(6):2165-76.
265. Vakkasoglu A. FTIR difference spectroscopy studies on membrane proteins. Champaign: University of Illinois at Urbana; 2008.
266. Italian.merryapi.com. (2017). [Internet]. [Erişim Tarihi 26 Ocak 2017] Erişim adresi: <http://italian.merryapi.com/quality-5734308-ciprofloxacin-hydrochloride-cas-no-86393-32-0-antibiotic-and-antimicrobial-agents-for-pharmaceutical>
267. Hoang Thi TH, Chai F, Leprêtre S, Blanchemain N, Martel B, Siepmann F ve ark. Bone implants modified with cyclodextrin: Study of drug release in bulk fluid and into agarose gel. *Int J Pharm*. 2010;400(1–2):74-85.
268. Dorofeev VL, Arzamastsev AP, Veselova OM. Melting Point Determination for the Analysis of Drugs of the Fluoroquinolone Group. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2004;38(6):333-5.
269. Gorman EM, Samas B, Munson EJ. Understanding the dehydration of levofloxacin hemihydrate. *J Pharm Sci*. 2012;101(9):3319-30.
270. Hoang Thi TH, Chai F, Lepretre S, Blanchemain N, Martel B, Siepmann F ve ark. Bone implants modified with cyclodextrin: study of drug release in bulk fluid and into agarose gel. *Int J Pharm*. 2010;400(1-2):74-85.
271. N-Acetyl-L-cysteine [Internet]. [Erişim Tarihi 26 Ocak 2017]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Acetyl-L-cysteine#section=Color>
272. Gordon MS. Processes for spray drying hydrophobic drugs in organic solvent suspensions (Google Patents) [Internet]. 1999 [Erişim Tarihi 26 Ocak 2017] Erişim adresi: <http://www.google.com/patents/US5976574>
273. Gulsun T, Budak C, Vural I, Sahin S, Oner L. Preparation and characterization of nimesulide containing nanocrystal formulations. *Pharm Dev Technol*. 2013;18(3):653-9.

274. Westerman EM, De Boer AH, Le Brun PPH, Touw DJ, Roldaan AC, Frijlink HW ve ark. Dry powder inhalation of colistin in cystic fibrosis patients: A single dose pilot study. *J Cyst Fibros*. 2007;6(4):284-92.
275. Sweeney LG, Wang Z, Loebenberg R, Wong JP, Lange CF, Finlay WH. Spray-freeze-dried liposomal ciprofloxacin powder for inhaled aerosol drug delivery. *Int J Pharm*. 2005;305(1-2):180-5.
276. Gaspar MC, Sousa JJ, Pais AA, Cardoso O, Murtinho D, Serra ME ve ark. Optimization of levofloxacin-loaded crosslinked chitosan microspheres for inhaled aerosol therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;96:65-75.
277. Martinelli F, Balducci AG, Rossi A, Sonvico F, Colombo P, Buttini F. "Pierce and inhale" design in capsule based dry powder inhalers: Effect of capsule piercing and motion on aerodynamic performance of drugs. *Int J Pharm*. 2015;487(1-2):197-204.
278. Ong HX, Traini D, Young PM. Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(9):1287-302.
279. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

8. EKLER

EK-1: Tez Kapsamında Yapılan Çalışmalar

PROJE

Antibiyotik ve mukolitik içeren inhaler formülasyonu tasarımı, karakterizasyonu ve permeabiliteye etkilerinin değerlendirilmesi. 01.03.2014-01.03.2015, Tübitak 1002 Hızlı Destek Projesi, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Levent Öner, Araştırmacılar: Prof. Dr. Selma Şahin, Prof. Dr. İmran Vural, **Bursiyer: Yağmur Akdağ Çaylı.**

YAYIN

1. Yağmur Akdag Cayli, Selma Sahin, Francesca Buttini, Anna Giulia Balducci, Serena Montanari, Imran Vural, Levent Oner, “Dry powders for the inhalation of ciprofloxacin or levofloxacin combined with a mucolytic agent for cystic fibrosis patients”, Drug Development and Industrial Pharmacy, (basımda).

BİLDİRİLER

1. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Formulation and Characterization of Ciprofloxacin Nanoparticles for Use in Dry Powder Inhalers”, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 Eylül 2014, Antalya-Türkiye.

2. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Formulation and Characterization of Antibiotic and Mucolytic Containing Dry Powder Inhaler Formulations”, 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery, 13-14 Nisan 2015, Reims-Fransa.

3. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Formulation and Characterization of Levofloxacin and Mucolytic Containing Dry Powder Inhaler Formulations”, 3rd International TB-Meeting, 14-16 Ekim 2015, Parma-İtalya.

4. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Formulation and Characterization of Ciprofloxacin and Mucolytic Containing Dry Powder Inhaler Formulations”, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando- USA.

5. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Evaluation of Permeability of Levofloxacin Containing Dry Powder Inhaler Across Calu-3 Cell Line”, 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 18-21 Eylül 2016, Antalya-Türkiye.

6. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, F. Buttini, A.G. Balducci, S. Montanari, I. Vural, L. Oner, “Determination and Evaluation of Aerodynamic Parameters of Ciprofloxacin and Mucolytic Containing Dry Powder Inhalers”, The Globalization of Pharmaceutics Education Network (GPEN) 2016, 9-12 Kasım 2016, Kansas-Lawrence/ABD.

7. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Determination of Permeability of Ciprofloxacin Dry Powder Inhaler Formulations Across Calu-3 Cell Line”, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Colorado, USA.

8. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Development and Validation of an HPLC method for Simultaneous Determination of Ciprofloxacin, Levofloxacin and N-acetylcysteine”, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Colorado, USA.

9. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, F. Buttini, A.G. Balducci, S. Montanari, I. Vural, L. Oner, “Levofloxacin Dry Powder for Inhalation by Spray Drying Method”, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Colorado, USA.

BLOG

Yağmur Akdag Cayli, Selma Sahin, Levent Oner, “Combination Therapy to Surmount Viscous Mucus Obstacle in Cystic Fibrosis”, AAPS Blog, 2015.

9. ÖZGEÇMİŞ

İsim : Yağmur AKDAĞ ÇAYLI
Doğum Tarihi ve Yeri : 19/09/1987, ELAZIĞ
İş Adresi : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
E-mail Adresi : yagmur.akdag@hacettepe.edu.tr

EĞİTİM DURUMU

Lise (2001-2005): İzmir Atatürk Anadolu Lisesi, İzmir
Üniversite (2005- 2010): Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara
Doktora (2011-): Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji
AD, Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Bilim Dalı Doktora
Programı

Doktora Tezi: *Antibiyotik İçeren Kuru Toz İnhaler Formülasyonu Tasarımı ve Permeabilite Çalışmaları (Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Levent Öner)*

YAYINLAR

1. **Yagmur Akdag Cayli**, Selma Sahin, Francesca Buttini, Anna Giulia Balducci, Serena Montanari, Imran Vural, Levent Oner, “Dry powders for the inhalation of ciprofloxacin or levofloxacin combined with a mucolytic agent for cystic fibrosis patients”, Drug Development and Industrial Pharmacy, (basımda).
2. Esra Demirturk, Tugba Gulsun, **Yagmur Akdag Cayli**, Nihan Izat, Selma Sahin, Levent Oner, “Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation of Rofecoxib Containing Bovine Serum Albumin Microspheres”, Latin American Journal of Pharmacy, (basımda).

BİLDİRİLER

1. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Formulation and Characterization of Ciprofloxacin Nanoparticles for Use in Dry Powder Inhalers”, 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 Eylül 2014, Antalya-Türkiye.
2. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Formulation and Characterization of Antibiotic and Mucolytic Containing Dry Powder Inhaler Formulations”, 1st European Conference on Pharmaceutics: Drug Delivery, 13-14 Nisan 2015, Reims-Fransa.
3. S. Sahin, **Y. Akdag Cayli**, T. Gulsun, N. Izat, L. Oner, “Permeability studies of orally disintegrating tablets containing deferasirox”, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 10-12 Eylül 2015, Helsinki-Finlandiya.
4. S. Sahin, N. Izat, **Y. Akdag Cayli**, T. Gulsun, L. Oner, “Investigation of metformin permeability from commercially available metformin hydrochloride tablets”, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 10-12 Eylül 2015, Helsinki-Finlandiya.
5. S. Sahin, T. Gulsun, N. Izat, **Y. Akdag Cayli**, L. Oner, “Investigation of permeabilities of metformin and glyburide from orally disintegrating tablets”, 6th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 10-12 Eylül 2015, Helsinki-Finlandiya.
6. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Formulation and Characterization of Levofloxacin and Mucolytic Containing Dry Powder Inhaler Formulations”, 3rd International TB-Meeting, 14-16 Ekim 2015, Parma-İtalya.
7. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, “Formulation and Characterization of Ciprofloxacin and Mucolytic Containing Dry Powder Inhaler Formulations”, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando-ABD.
8. T. Gulsun, N. Izat, **Y. Akdag Cayli**, M.S. Kaynak, L. Oner, S. Sahin, “Development of Metformin Hydrochloride and Glyburide Containing Orally Disintegrating Tablets”, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando-ABD.

9. N. Izat, **Y. Akdag Cayli**, T. Gulsun, L. Oner, S. Sahin, "Evaluation of Dissolution Results of Commercially Available Metformin Hydrochloride Tablets", 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando-ABD.
10. **Y. Akdag Cayli**, T. Gulsun, N. Izat, S. Sahin, L. Oner, "Preparation and Evaluation of Deferasirox Containing Orally Disintegrating Tablets by Direct Compression Method", 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 Ekim 2015, Orlando-ABD.
11. T. Gulsun, N. Izat, **Y. Akdag Cayli**, L. Oner, S. Sahin, "Influence of Verapamil on Metformin Permeability Across Caco-2 Cells", GPSS 2015, 12-15 Kasım 2015, Antalya-Türkiye.
12. T. Gulsun, N. Izat, **Y. Akdag Cayli**, E. Demirtürk, M. Çetin, L. Oner, S. Sahin, "Development and in Vitro Evaluation of Deferasirox Orally Disintegrating Tablets by Lyophilization Method", IPTS 2016, 18-21 Eylül 2016, Antalya-Türkiye.
13. E. Demirtürk, N. Izat, **Y. Akdag Cayli**, T. Gulsun, S. Sahin, L. Oner, "Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Rofecoxib", IPTS 2016, 18-21 Eylül 2016, Antalya-Türkiye.
14. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, "Evaluation of Permeability of Levofloxacin Containing Dry Powder Inhaler Across Calu-3 Cell Line", 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 18-21 Eylül 2016, Antalya-Türkiye.
15. N. Izat, **Y. Akdag Cayli**, T. Gulsun, E. Demirtürk, M. Çetin, L. Oner, S. Sahin, "Preparation and Evaluation of Lyophilized Orally Disintegrating Tablets Containing Terbutaline Sulphate", IPTS 2016, 18-21 Eylül 2016, Antalya-Türkiye.
16. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, F. Buttini, A.G. Balducci, S. Montanari, I. Vural, L. Oner, "Determination and Evaluation of Aerodynamic Parameters of Ciprofloxacin and Mucolytic Containing Dry Powder Inhalers", The Globalization of Pharmaceuticals Education Network (GPEN) 2016, 9-12 Kasım 2016, Kansas-Lawrence/ABD.
17. T. Gulsun, **Y. Akdag Cayli**, N. Izat, L. Oner, S. Sahin, "Effect of Particle Size on Deferasirox Dissolution Time", 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Denver-Colorado/ABD.

18. **Y. Akdag Cayli**, T. Gulsun, N. Izat, L. Oner, S. Sahin, "Evaluation of Surfactant Effect on the Saturation Solubility and Permeability of Deferasirox", 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Denver-Colorado/ABD.

19. **Y. Akdag Cayli**, T. Gulsun, N. Izat, L. Oner, S. Sahin, "Formulation and Characterization of Mometasone Furoate Monohydrate and Formoterol Fumarate Dihydrate Containing Dry Powder Inhaler Formulations", 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Denver-Colorado/ABD.

20. N. Izat, **Y. Akdag Cayli**, T. Gulsun, M.S. Kaynak, L. Oner, S. Sahin, "Development and Evaluation of Terbutaline Sulfate Containing Orally Disintegrating Tablets", 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Denver-Colorado/ABD.

21. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, "Determination of Permeability of Ciprofloxacin Dry Powder Inhaler Formulations Across Calu-3 Cell Line", 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Denver-Colorado/ABD.

22. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, I. Vural, L. Oner, "Development and Validation of an HPLC method for Simultaneous Determination of Ciprofloxacin, Levofloxacin and N-acetylcysteine", 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Denver-Colorado/ABD.

23. **Y. Akdag Cayli**, S. Sahin, F. Buttini, A.G. Balducci, S. Montanari, I. Vural, L. Oner, "Levofloxacin Dry Powder for Inhalation by Spray Drying Method", 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Denver-Colorado/ABD.

PROJE

Antibiyotik ve mukolitik içeren inhaler formülasyonu tasarımı, karakterizasyonu ve permeabiliteye etkilerinin değerlendirilmesi. 01.03.2014-01.03.2015, Tübitak 1002 Hızlı Destek Projesi, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Levent Öner, Araştırmacılar: Prof. Dr. Selma Şahin, Prof. Dr. İmran Vural, **Bursiyer: Yağmur Akdağ Çaylı.**

BLOG

Yagmur Akdag Cayli, Selma Sahin, Levent Oner, “Combination Therapy to Surmount Viscous Mucus Obstacle in Cystic Fibrosis”, AAPS Blog, 2015.

ÜYE OLDUĞU TOPLULUKLAR

1. Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)
2. Hacettepe Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Derneği (HETEK)
3. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)
4. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği

KATILDIĞI TOPLANTILAR

1. 3. Lisansüstü Eğitim Sempozyumu, 8 Aralık 2010, Hacettepe Üniversitesi, Ankara-Türkiye.
2. Medikal İnovasyon Platformu (Mediplat) Konferansı, 25 Şubat 2011, Ankara-Türkiye.
3. 18th International Symposium on Microencapsulation, 12-14 Eylül 2011, Antalya-Türkiye.
4. Tasarımla Kalite (Quality by Design – QbD) Regülasyonlar Doğrultusunda Endüstriyel Uygulamalar, 13-14 Ocak 2012, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara-Türkiye.
5. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 19 - 22 Mart 2012, İstanbul-Türkiye.
6. TÜFTAD- “Tıbbi Cihazlar: Ürün Geliştirme, Regülasyonlar ve Klinik Uygulamalar”, 4 Temmuz 2012, Hilton Otel, Ankara-Türkiye.
7. 16th International Pharmaceutical Technology Symposium, 10-12 Eylül 2012, Antalya-Türkiye.
8. Kozmetik Ürünlerde Teknik Dosya Hazırlanması, Testler ve Değerlendirmeler, 19 Haziran 2014, Hacettepe Üniversitesi, Ankara-Türkiye.
9. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium, 8-10 Eylül 2014, Antalya-Türkiye.
10. AAPS 2014 2-6 Kasım 2014, San Diego-Amerika.

11. İnhaler Ürünler – Üretimden Hastaya, 5-6 Mart 2015, İstanbul-Türkiye.
12. 1st European Conference on Pharmaceutics : Drug Delivery, 13-14 Nisan 2015, Reims-Fransa.
13. 3rd International TB-Meeting, 14-16 Ekim 2015, Parma-İtalya.
14. 18th International Pharmaceutical Technology Symposium, 18-21 Eylül 2016, Antalya-Türkiye.
15. The Globalization of Pharmaceutics Education Network (GPEN) 2016, 9-12 Kasım 2016, Kansas-Lawrence/ABD.
16. 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, 13-17 Kasım 2016, Denver-Colorado/ABD

KATILDIĞI EĞİTİMLER

1. “Web of Science” veri tabanının tanıtım ve kullanımına yönelik eğitim semineri, (4 Nisan 2011, Ankara-Türkiye.
2. MATLAB ve Simulink ile Görüntü İşleme Semineri, 14 Nisan 2011, Ankara-Türkiye.
3. Figes – MATLAB Fundamentals eğitimi, 12-13 Mayıs 2011, Ankara-Türkiye.
4. MATLAB & Simulink ile Sinyal İşleme ve Haberleşme Sistemleri Semineri, 17 Mayıs 2011, Ankara-Türkiye.
5. SEM endüstri cihazları semineri, 29 Eylül 2011, Büyükhanlı Park Hotel, Ankara-Türkiye.
6. İZGÖREN AKADEMİ Sunum teknikleri eğitim programı, 26-27 Kasım 2011, Hacettepe Üniversitesi, Ankara-Türkiye.
7. Su Kirlilikleri, Su Tipleri, Su Arıtma Teknolojileri, Suda Bulunan Kirliliklerin Analizlere Etkileri konulu “Su Seminerleri”, 20 Ocak 2012, Hacettepe Üniversitesi, Ankara-Türkiye.
8. Millipore marka Milli-Q Integral model Ultra Saf Su cihazına ilişkin “Kullanıcı Eğitim Programı”, 20 Ocak 2012, Hacettepe Üniversitesi, Ankara-Türkiye.
9. TÜBİTAK-Sağlık Bilimleri Alanında Uygulamalı Araştırma Projesi Etkinliği, 10 Mayıs ve 28 Mayıs 2013, Hacettepe Üniversitesi, Ankara-Türkiye.
10. FATUM-Nadir Hastalıklar ve Yetim İlaçlar Simpozyumu, 21 Haziran 2013.

11. iThenticate ve Turnitin Programları Eğitim Semineri, 22 Ocak 2014, H.Ü. Kültür Merkezi Kırmızı Salon, Sıhhiye ANKARA, Eğitimci: Dr. Görkem Mergen.
12. Springer-“How to Publish a Scientific Journal Article”, 26-30 Mayıs 2014, Ankara-Türkiye.
13. Laboratuvar Güvenliği Eğitimi Programı, 17-18 Ekim 2014, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
14. “Genç Liderleri Yetiştirme Seminerleri”, İlaç Araştırmacıları ve Uygulayıcıları Derneği (İLARUD), 10 Haziran 2016, Ankara, Türkiye.

