

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TIBBİ CİHAZ UYGULAMALARINA BAĞLI OLARAK GELİŞEN
BİYOFİLM BAZLI OSTEOMİYELIT TEDAVİSİ İÇİN POLİMERİK
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN FORMÜLASYONU VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Elif SARIGÖL

Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2013

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TIBBİ CİHAZ UYGULAMALARINA BAĞLI OLARAK GELİŞEN
BİYOFİLM BAZLI OSTEOMİYELIT TEDAVİSİ İÇİN POLİMERİK
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN FORMÜLASYONU VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Elif SARIGÖL

Farmasötik Teknoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ

ANKARA


2013


Anabilim Dalı : Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
 Program : Farmasötik Teknoloji / Tezli Yüksek Lisans
 Tez Başlığı : Tıbbi Cihaz Uygulamalarına Bağlı Olarak Gelişen Biyofilm
 Bazlı Osteomyelit Tedavisi İçin Polimerik İlaç Taşıyıcı
 Sistemlerin Formülasyonu ve Değerlendirilmesi
 Öğrenci Adı-Soyadı : Elif Sarıgöl
 Savunma Sınavı Tarihi : 22.01.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sema Çalış (Hacettepe Üniversitesi) 

(Tez Danışmanı)

Üye: Prof. Dr. Bülent Atilla (Hacettepe Üniversitesi) 

Üye: Prof. Dr. İmran Vural (Hacettepe Üniversitesi) 

Üye: Doç. Dr. Meral Özalp (Hacettepe Üniversitesi) 

Üye: Doç. Dr. Sibel Pehlivan (Hacettepe Üniversitesi) 

ONAY

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


 Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilimsel bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her zaman yanımda olan, karşılaştığım her türlü sorunu çözmek için beni tüm özverisi ile destekleyen ve beni tam bir akademik personel olarak yetiştiren değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Sema ÇALIŞ**'a, tezim süresince bilimsel katkıları ve kişisel desteğini benden esirgemeyen, her konuda her zaman yardımını gördüğüm değerli hocam Sayın **Doç. Dr. Sibel PEHLİVAN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın mikrobiyolojik alanında her türlü bilimsel desteği sağlayan değerli hocalarım Sayın **Doç. Dr. Meral ÖZALP** ve Sayın **Öğr. Gör. Dr. Ecz. Melike EKİZOĞLU**'na, biyokimyasal değerlendirmelerimde bilimsel ve kişisel desteğini esirgemeyen hocam Sayın **Doç. Dr. Ebru BODUR**'a, *in vivo* çalışmalar alanında bilimsel açıdan beni destekleyen hocalarım Sayın **Prof. Dr. Bülent ATILLA** ve Sayın **Doç. Dr. Ömür ÇAĞLAR**'a teşekkürlerimi sunarım.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri analizlerimi değerlendirmede bana yardımcı olan hocam Sayın **Doç. Dr. Neslihan GÜRSOY**'a, reolojik ölçümlerim için bana yardımcı olan hocam Sayın **Prof. Dr. Süeda HEKİMOĞLU**'na ve reolojik ölçümlerim için bana Anabilim Dallarının kapılarını açan Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Yasemin YAZAN**'a ve ölçümlerim sırasında bana yardımcı olan Sayın **Yard. Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ** ve **Yard. Doç. Dr. Murat Sami BERKMAN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince gerek bilimsel gerek psikolojik desteklerini benden esirgemeyen sevgili yol arkadaşlarım **Selin S. DOĞAN**, **Kıvılcım ÖZTÜRK**, **Seçil TOKTAŞ**, **Yağmur ÇAYLI**, **Tuğba GÜLSÜN İNAL**, **Nazlı ERDOĞAR**, **Burçin YAVUZ**, **Hakan ULUSAY**, **Yasemin ÇIRPANLI**, **Can SARISÖZEN** ve **Semih ÇALAMAK**'a acı tatlı her anımda hep yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sevgi ve anlayışları ile beni destekleyen, her türlü maddi ve manevi imkanı bana sunan, çoğu zaman gülen yüzümü istemeden de olsa esirgediğim, buna rağmen hep şefkat ile beni karşılayan, beni “ben” olarak yetiştiren canım anneme, babama ve kardeşime tüm kalbimle çok teşekkür ederim.

ÖZET

Sarıgöl, E. Tıbbi Cihaz Uygulamalarına Bağlı Olarak Gelişen Biyofilm Bazlı Osteomyelit Tedavisi İçin Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyonu Ve Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013. Tıbbi cihaz uygulamalarına bağlı olarak gelişen biyofilm bazlı osteomyelitte (BBMCKO), biyofilm kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç göstermekte ve antibiyotiğin enfekte olan dokuya yetersiz veya gecikmiş penetrasyonuna neden olarak tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, BBMCKO'nun tedavisi için, cerrahi bir girişim gerektirmeksizin bölgeye direkt enjeksiyon ile uygulanabilecek, bölgede oluşmuş olan biyofilmi kırarak enfeksiyonu tedavi için uzun süreli tedavi dozunda antibiyotik konsantrasyonunu sağlayabilecek ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasında, düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı molekül ağırlığındaki biyouyumlu-biyoparçalanır özellikteki polikaprolakton (PCL) polimeri kullanılarak, metisilin rezistan *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde birinci sırada tercih edilen antibiyotik olan vankomisin hidroklorürü (VA) içeren ve kontrollü salımını sağlayacak mikroküreleri hazırlanmış, gamma radyasyon ile sterilize edilmiş ve sterilizasyon öncesi ve sonrası mikrokürelerin üretim verimi, partikül büyüklüğü, yüzey morfolojisi, VA yükleme etkinliği, *in vitro* VA salım profilleri ve yapısal özellikleri açısından *in vitro* karakterizasyonları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonrasında, VA yüklü PCL mikroküreleri ve serbest halde, antibiyofilm aktivitesi olduğu bildirilen enzim yapıdaki serratiopeptidaz (SP) ile VA'yı içeren termosensitif kitosan ve pluronik jel formülasyonları hazırlanmış, reolojik yönden ve *in vitro* VA ve SP salım profilleri açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca *in vitro* koşullarda biyofilm oluşturulmuş, jel formülasyonlarından antibiyofilm aktivitesi en yüksek olanı seçilerek *in vivo* pilot çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucu, BBMCKO'nun tedavisinde önemli bir basamak olan biyofilmin kırılması başarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Vankomisin hidroklorür, serratiopeptidaz, biyofilm bazlı osteomyelit, PCL mikroküre, termosensitif jel, lokal ilaç taşınması

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK Hızlı Destek Programı 1002 Projesi (SBAG, 111S275), TÜBİTAK.

ABSTRACT

Sarıgöl, E., Formulation And In Vitro/In Vivo Evaluation Of Polymeric Drug Delivery Systems For The Treatment Of Biofilm-Based Medical Device-Related Osteomyelitis, Hacettepe University Health Sciences Institute, Pharmaceutical Technology Programme, Master Thesis, Ankara, 2013. Medical device is a suitable substrate for bacteria in order to form biofilm which causes a high resistance to used antibiotics and slow or incomplete penetration of antibiotic to infected area, which makes the treatment of medical device-related (MDRO) osteomyelitis more difficult. Therefore, drug delivery system with direct injection to the infected site without surgery is required for the treatment of MDRO. Hence, breaking of biofilm and high antibiotic concentration which required for long term therapy could be provided. In this study vancomycin hydrochloride (VA) was encapsulated in low, medium and high molecular weight biocompatible-biodegradable polycaprolactone (PCL) polymer and is used to prepare VA encapsulated microspheres. After preparation of the microspheres are sterilized by gamma irradiation and before and after sterilization microspheres were characterized through particle size determination, encapsulation efficiency, surface morphology determinations, in vitro release studies, DSC thermograms and FT-IR spectrums. After these studies, thermosensitive chitosan and pluronic gels carrying serratiopeptidase (SP) enzyme, VA and VA loaded PCL microspheres were prepared and characterized through rheological properties and in vitro VA and SP release properties. By the way, an *in vitro* biofilm model was developed and after the antibiofilm activity studies the most effective gel formulation was chosen for *in vivo* pilot studies. The results indicated that the biofilm, the most important part for the treatment of MDRO, is successfully broken by the chosen gel formulation.

Key Words: Vancomycin hydrochloride, Serratiopeptidase, Biofilm based osteomyelitis, PCL microspheres, Thermosensitive gels, local drug delivery

Supporting Institute: TÜBİTAK Short Term R&D Funding Program (SBAG, 111S275), TÜBİTAK.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
TABLolar DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tıbbi Cihazlar	4
2.1.1. Ortopedide Kullanılan Tıbbi Cihazlar	4
2.1.1.1. Ortopedik Biyomateryallerin Özellikleri ve Materyal Tipleri	6
2.1.1.1.1. Metaller	7
2.1.1.1.2. Polimerler	8
2.1.1.1.3. Seramikler	8
2.2. Osteomiyelit	8
2.2.1. Kemik	8
2.2.2. Osteomiyelit Tanım	9
2.2.3. Osteomiyelit Etiyolojisi	10
2.2.4. Osteomiyelit Etkenleri	11
2.2.4.1. Tıbbi Cihaz Kaynaklı Osteomiyelit	11
2.2.5. Osteomiyelitte Tedavi Yaklaşımları	12
2.3. Biyofilm	14
2.3.1. Biyofilmin Yapısı	14
2.3.2. Biyofilm Oluşum Mekanizmaları	15
2.3.3. Tıbbi Cihazlarda Biyofilm	18
2.3.4. Anti-Biyofilm Yaklaşımları	19
2.3.4.1. Tıbbi Cihaz Yüzeyine Bakteri Yapışmasının Engellenmesi	19
2.3.4.2. Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi	20

2.3.4.3.	Oluşmuş Bir Biyofilmin Ortadan Kaldırılmasında İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Rolü	20
2.3.5.	Staphylococcus spp. Kaynaklı Biyofilm	21
2.4.	Mikroküreler	21
2.4.1.	Mikrokürelerin Özellikleri	21
2.4.2.	Mikrokürelerin Kullanım Alanları	22
2.4.3.	Mikroküre Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	22
2.4.3.1.	Polikaprolakton (PCL) Polimeri	24
2.4.4.	Mikrokürelerin Hazırlama Yöntemleri	25
2.4.4.1.	Emülsiyon Oluşturma – Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	26
2.4.4.1.1.	Çoklu Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	26
2.4.5.	Mikrokürelerin Karakterizasyonları	27
2.4.6.	Mikrokürelerin Sterilizasyonları	28
2.5.	Jeller	28
2.5.1.	Jellerin Sınıflandırılması	28
2.5.1.1.	Lipofilik Jeller	29
2.5.1.2.	Hidrofilik Jeller	29
2.5.2.	Jellerin Mikro Yapısı	29
2.5.3.	Termosensitif Hidrojeller	30
2.5.3.1.	Kitosan Termosensitif Hidrojeller ve Hazırlama Şekilleri	31
2.5.3.2.	Poloksamer Termosensitif Hidrojeller ve Hazırlanma Şekilleri	32
2.6.	Serratiopeptidaz	33
2.6.1.	Fizikokimyasal Özellikleri	33
2.6.2.	Farmakolojik Özellikleri	33
2.6.3.	Serratiopeptidaz Enzim Aktivitesi Tayin Yöntemleri	34
2.7.	Vankomisin	35
2.7.1.	Fizikokimyasal Özellikleri	35
2.7.2.	Vankomisinin Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri	36
2.7.3.	Vankomisin Miktar Tayini Yöntemleri	37

2.7.3.1.	Vankomisin Miktarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Tayini	37
2.7.4.	Vankomisinin Piyasa Preparatları	38
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1.	Araç ve Gereçler	39
3.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.1.2.	Kullanılan Biyolojik Maddeler	39
3.1.3.	Kullanılan Aletler	40
3.2.	Yöntem	41
3.2.1.	Vankomisinin Kimyasal, Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Tayini	41
3.2.1.1.	Vankomisin HCl'nin UV Spektrumu	41
3.2.1.2.	Vankomisin HCl'nin Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu	41
3.2.1.3.	Vankomisin HCl'nin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramı	41
3.2.1.4.	Vankomisin HCl'nin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Saptanması	42
3.2.1.5.	Vankomisin HCl'ün HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) ile Miktar Tayini	43
3.2.1.5.1.	Analitik Yöntem Validasyonu	44
3.2.1.5.1.1.	Doğrusallık ("Linearity")	44
3.2.1.5.1.2.	Kesinlik ("Precision")	45
3.2.1.5.1.3.	Duyarlılık ("Sensitivity")	46
3.2.1.5.1.4.	Özgünlük ("Specificity")	46
3.2.1.5.1.5.	Stabilite ("Stability")	46
3.2.2.	Serratiopeptidazın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	47
3.2.2.1.	Serratiopeptidazın UV Spektrumu	47
3.2.2.2.	Serratiopeptidazın FT-IR Spektrumu	47
3.2.2.3.	Serratiopeptidazın DSC Termogramı	47
3.2.3.	Formülasyon Çalışmaları	47
3.2.3.1.	Boş Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Partikül Büyüklüğünün Ayarlanması	47
3.2.3.2.	Vankomisin HCl Yüklü PCL Mikrokürelerin Hazırlanması	49

3.2.3.3.	PCL Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu	51
3.2.3.3.1	Morfolojik Özellikler	52
3.2.3.3.2..	Mikrokürelerin Partikül Büyüklüğünün Tayini	52
3.2.3.3.3.	Mikrokürelerin Üretim Verimi	52
3.2.3.3.4.	Mikrokürelerde Yükleme Veriminin Tayini	53
3.2.3.3.5.	Mikrokürelerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi	53
3.2.3.3.5.1.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	53
3.2.3.3.5.2.	DSC Analizi	53
3.2.3.3.6.	Mikrokürelerden İn Vitro Salım Deneyleri	54
3.2.3.3.6.1.	Antibiyotik Yüklü PCL Mikrokürelerden Vankomisin HCl Salımının Tespiti	54
3.2.3.3.6.2.	İN Vitro Salım Deneyleri Sonrasında Antibiyotiğin Kimyasal Stabilitesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi	55
3.2.3.4.	Steril PCL Mikrokürelerin Hazırlanması	55
3.2.3.4.1.	PCL Mikrokürelerinin Sterilizasyonu	55
3.2.3.4.2.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Sterilite Kontrolü	55
3.2.3.4.3.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerde Karakterizasyon Çalışmaları	56
3.2.3.4.3.1.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi	56
3.2.3.4.3.1.1.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	56
3.2.3.4.3.1.2.	DSC Analizi	56
3.2.3.4.3.2.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Yüzey Özellikleri	56
3.2.3.4.3.3.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Partikül Büyüklüğünün Tayini	57
3.2.3.4.3.4.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerde Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Tayini	57
3.2.3.4.3.5.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinden Vankomisin HCl Salımının Tespiti	57
3.2.3.4.3.6.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinden Salınan Vankomisin HCL'ün Kimyasal Stabilitesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi	58
3.2.3.5.	İlaç İçeren Termosensitif Hidrojellerin Hazırlanması ve İlaç Yüklü Jel Formülasyonu Üzerinde	58

	Sterilizasyon Öncesi ve Sonrası Karakterizasyon Çalışmaları	
3.2.3.5.1.	İlaç İçeren Steril Jel Formülasyonlarının Hazırlanması	58
3.2.3.5.1.1.	Boş Termosensitif Kitosan Hidrojellerinin Hazırlanması	58
3.2.3.5.1.2.	Boş Termosensitif Pluronik Hidrojellerinin Hazırlanması	58
3.2.3.5.1.3.	Boş Kitosan ve Pluronik Jellerin Otoklav ile Sterilizasyonu	59
3.2.3.5.1.4.	Serratopeptidaz-VA ve VA Yüklü Steril Mikroküre İçeren Termosensitif Pluronik ve Kitosan Hidrojellerinin Hazırlanması	59
3.2.3.5.2.	Jelleşme Sıcaklığının Tespit Edilmesi ve Viskozitenin Değerlendirilmesi	59
3.2.3.5.3.	İlaç Yüklü Steril Jel Formülasyonundan İn Vitro Salım Deneyleri ve Validasyonu	60
3.2.3.5.3.1.	İN Vitro Salım Deneyleri Sonrasında Antibiyotik Kimyasal Stabilitesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi	61
3.2.3.5.3.2.	İN Vitro Salım Deneyleri Sonrasında Serratiopeptidazın Aktivitesinin İncelenmesi	61
3.2.3.6.	Hazırlanan Steril Preparatların İn Vitro Anti-biyofilm Aktivitesinin İncelenmesi	62
3.2.3.6.1.	İN Vitro Ortamda Biyofilm Oluşturulması	62
3.2.3.6.2.	İN Vitro Antibiyofilm Aktivitesinin İncelenmesi	63
3.2.3.6.2.1.	İlaç Yüklü Jel Formülasyonlarının Antibiyofilm Aktivitesinin Gösterilmesi	66
3.2.3.6.3.	Steril Sonuç Jel Formülasyonunda Kullanılan Enzim-Antibiyotik-Polimerler Arasındaki Olası Etkileşimlerin İncelenmesi	66
3.2.3.6.4.	Steril Sonuç Jel Formülasyonunun İn Vitro Salım Deneyleri	67
3.2.3.6.4.1.	Steril Sonuç Jel Formülasyonundan VA Salım Profili	67
3.2.3.6.5.	Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan SP'nin in vitro Aktivitesinin Değerlendirilmesi	67
3.2.3.6.5.1.	Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Vankomisin Hidroklorürün Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi	68
3.2.3.6.5.2.	Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Salım Örneklerinin in vitro Antibiyofilm Aktivitesinin	68

	İncelenmesi	
3.2.4.	İn vivo Pilot Çalışmalar	68
3.2.4.1.	İn Vivo Çalışmalarda Kullanılacak Biyofilm Kaplı İmplantların ve Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması	68
3.2.4.2.	Cerrahi İşlem ve Tedavi Uygulaması	69
3.2.4.3.	Tavşanlara Tedavi Uygulamasını Takiben Yapılan Değerlendirmeler	71
3.2.4.3.1.	Mikrobiyolojik Değerlendirme	71
3.2.4.3.2.	Histolojik Değerlendirme	71
4.	BULGULAR	72
4.1.	Vankomisin Kimyasal, Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Tayini	72
4.1.1.	Vankomisin HCl'nin UV Spektrumu	72
4.1.2.	Vankomisin HCl'nin Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu	73
4.1.3.	Vankomisin HCl'nin Diferensiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramı	75
4.1.4.	Vankomisin HCl'nin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Saptanması	75
4.1.5.	Vankomisin HCl'nin Miktar Tayini ve Validasyonu	75
4.1.5.1.	Analitik Yöntem Validasyonu	76
4.1.5.1.1.	Doğrusallık ("Linearity")	76
4.1.5.1.2.	Keskinlik ("Precision")	77
4.1.5.1.3.	Duyarlılık ("Sensitivity")	78
4.1.5.1.4.	Özgünlük ("Specificity")	79
4.1.5.1.5.	Stabilite ("Stability")	80
4.2.	Serratiopeptidazın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	81
4.2.1.	Serratiopeptidazın UV Spektrumu	81
4.2.2.	Serratiopeptidazın FT-IR Spektrumu	82
4.2.3.	Serratiopeptidazın DSC Termogramı	84
4.3.	Formülasyon Çalışmaları	84
4.3.1.	PCL Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu	84
4.3.1.1.	Morfolojik Özellikler	84
4.3.1.2.	Mikrokürelerin Partikül Büyüklüğünün Tayini	88

4.3.1.3.	Mikrokürelerin Üretim Verimi	91
4.3.1.4.	Mikrokürelerde Yükleme Veriminin Tayini	91
4.3.1.5.	Mikrokürelerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi	92
4.3.1.5.1.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	92
4.3.1.5.2.	DSC Termogramlarının İncelenmesi	94
4.3.1.6.	Mikrokürelerden İn Vitro Vankomisin HCl Salım Deneyleri	94
4.3.1.6.1.	İN Vitro Salım Deneyleri Sonrasında Antibiyotiğin Kimyasal Stabilitesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi	97
4.3.2.	Steril PCL Mikrokürelerin Hazırlanması	98
4.3.2.1.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Sterilite Kontrolü	98
4.3.2.2.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerde in vitro Karakterizasyon Çalışmaları	98
4.3.2.3.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi	98
4.3.2.3.1.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	98
4.3.2.3.2.	DSC Analizi	99
4.3.2.3.3.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Yüzey Özellikleri	100
4.3.2.3.3.1.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Partikül Büyüklüğünün Tayini	105
4.3.2.3.3.2.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerde Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Tayini	106
4.3.2.3.3.3.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerden İn Vitro Salım Deneyleri	106
4.3.2.3.3.3.1.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinden Salınan Vankomisin HCL'ün Kimyasal Stabilitesinin İncelenmesi	109
4.3.2.3.3.4.	İlaç İçeren Termosensitif Hidrojellerin Hazırlanması ve İlaç Yüklü Jel Formülasyonları Üzerinde Sterilizasyon Öncesi ve Sonrası Karakterizasyon Çalışmaları	110
4.3.2.3.3.4.1.	Jelleşme Sıcaklığının Tespiti ve Viskozitenin Değerlendirilmesi	110
4.3.2.3.3.4.2.	İlaç Yüklü Steril Jel Formülasyonundan in vitro Salım Deneyleri ve Validasyonu	117

4.3.2.3.3.4.3.	İn Vitro Salım Deneyleri Sonrasında Serratiopeptidazın Aktivitesinin İncelenmesi	121
4.3.2.3.3.4.4.	Hazırlanan Steril Preparatların İn Vitro Antibiyofilm Aktivitesinin İncelenmesi	122
4.3.2.3.3.4.4.1.	İn Vitro Ortamda Biyofilm Oluşturulması	122
4.3.2.3.3.4.4.2.	İlaç Yüklü Jel Formülasyonlarının Antibiyofilm Aktivitesinin Gösterilmesi	125
4.3.2.3.3.4.5.	Steril Sonuç Jel Formülasyonu Üzerinde Yapılan in vitro Deneyler	127
4.3.2.3.3.4.5.1.	Steril Sonuç Jel Formülasyonunda Kullanılan Enzim-Antibiyotik-Polimerler Arasındaki Olası Etkileşimlerin İncelenmesi	127
4.3.2.3.3.4.5.2.	Steril Sonuç Jel Formülasyonundan in vitro Salım Deneyleri	128
4.3.2.3.3.4.5.2.1.	Steril Sonuç Jel Formülasyonundan VA Salım Profili	129
4.3.2.3.3.4.5.2.2.	Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan SP'nin in vitro Aktivitesinin Değerlendirilmesi	129
4.3.2.3.3.4.5.2.3.	Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Salım Örneklerinin Antimikrobiyal Aktivitesi	131
4.3.2.3.3.4.5.2.4.	Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Salım Örneklerinin in vitro Antibiyofilm Aktivitesi	132
4.4.	İn vivo Pilot Çalışmalar	132
4.4.1.	İn vivo Çalışmalarda Kullanılacak Biyofilm Kaplı İmplantın SEM Görüntüleri	133
4.4.2.	Tavşanlara Tedavi Uygulamasını Takiben Yapılan Değerlendirmeler	133
4.4.2.1.	Mikrobiyolojik Değerlendirmeler	134
5.	TARTIŞMA	138
5.1.	Vankomisin Hidroklorürün Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri ile ilgili Çalışmalar	138
5.1.1.	Vankomisin Hidroklorürün Miktar Tayini ve Validasyonu	139
5.2.	Serratiopeptidazın Fizikokimyasal Özellikleri ile ilgili Çalışmalar	140
5.2.1.	Serratiopeptidazın UV Spektrumunun İncelenmesi	140
5.2.2.	Serratiopeptidazın FT-IR Spektrumunun İncelenmesi	140
5.2.3.	Serratiopeptidazın DSC Termogramının İncelenmesi	140
5.3.	Formülasyon Çalışmaları	141

5.3.1.	Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması	141
5.3.2.	Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu	142
5.3.2.1.	Morfolojik Özellikler	143
5.3.2.2.	Mikrokürelerin Üretim Verimi	144
5.3.2.3.	Partikül Büyüklüğü Tayini	145
5.3.2.4.	Mikrokürelere Yükelenen Vankomisin Hidroklorür Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	146
5.3.2.5.	FT-IR ile Mikrokürelerin Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi	147
5.3.2.6.	DSC ile Mikrokürelerin Termodinamik Özelliklerinin İncelenmesi	148
5.3.2.7.	İn Vitro Salım Deneyleri	148
5.3.3.	PCL Mikrokürelerinin Gama Radyasyon ile Sterilizasyonu ve Sterilite Kontrolü	150
5.3.3.1.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Yüzey Özellikleri	151
5.3.3.2.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Partikül Büyüklüğünün Tayini	152
5.3.3.3.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelere Yüklenen Antibiyotik Miktarının Belirlenmesi	153
5.3.3.4.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi	154
5.3.3.4.1.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	154
5.3.3.4.2.	DSC Analizi	154
5.3.3.5.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelere İnan Vitro Salım Deneyleri	154
5.3.3.6.	Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinden Salınan Vankomisin Hidroklorürün Kimyasal Stabilesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi	156
5.4.	İlaç İçeren Termosensitif Hidrojellerin Hazırlanması ve İlaç Yüklü Jel Formülasyonları Üzerinde Sterilizasyon Öncesi ve Sonrası Karakterizasyon Çalışmaları	157
5.4.1.	İlaç İçeren Steril Jel Formülasyonlarının Hazırlanması	157
5.4.2.	Jelleşme Sıcaklığının Tespit Edilmesi ve Viskozitenin Değerlendirilmesi	157
5.4.2.1.	İlaç Yüklü Steril Jel Formülasyonundan İnan Vitro Salım	159

	Deneyleeri ve Validasyonu	
5.4.2.2.	İn Vitro Salım Deneyleeri Sonrasında Serratiopeptidazın Aktivitesinin İncelenmesi	163
5.4.2.3.	Hazırlanan Steril Preparatların İn Vitro Anti-biyofilm Aktivitesinin İncelenmesi	164
5.4.2.3.1.	İn vitro Ortamda Biyofilm Oluşturulması	164
5.4.2.3.2.	İlaç Yüklü Jel Formülasyonlarının Antibiyofilm Aktivitesinin Gösterilmesi	168
5.4.2.4.	Steril Sonuç Jel Formülasyonunda Kullanılan Enzim-Antibiyotik-Polimerler Arasındaki Olası Etkileşimlerin İncelenmesi	168
5.4.2.5.	Sonuç Jel Formülasyonundan in vitro Salım Deneyleeri	169
5.4.2.5.1.	Sonuç Jel Formülasyonundan VA Salım Profili	169
5.4.2.5.2.	Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan SP'nin in vitro Enzimatik Aktivitesinin Değerlendirilmesi	170
5.4.2.5.3.	Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Salım Örneklerinin in vitro Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitesi Değerlendirilmesi	171
5.5.	İn vivo Pilot Çalışmalar	172
5.5.1.	Tavşanlara Tedavi Uygulanmasını Takiben Yapılan Değerlendirmeler	172
5.5.1.1.	Mikrobiyolojik Değerlendirmeler	173
6.	SONUÇ	174
	KAYNAKLAR	176
	ÖZGEÇMİŞ	192
	EKLER	194

SİMGELER VE KISALTMALAR

β - GP	β - Gliserofosfat
ATCC	American Type Culture Collection
BBMCKO	Biyofilm bazlı medikal cihaz kaynaklı osteomiyelitte
cgc	Kritik jel konsantrasyonu
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
cmc	Krtik misel konsantrasyonu
DCM	Diklorometan
dk	Dakika
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential scanning calorimetry)
EP	Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia)
EPS	Ekzopolisakkaritler
FT-IR	Fourier dönüşümü kızıl ötesi (Fourier transform infrared)
MHA	Müller Hinton agar
MHSB	Müller Hinton sıvı besiyeri
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyonu
M_n	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (Molecular number)
MRSA	Metisilin rezistan <i>Staphylococcus aureus</i> enfeksiyonu
M_w	Sayıca ortalama molekül ağırlığı (Molecular weight)
N.D.	Not determined
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate buffered saline)
PC	Proteaz ünitesi
PCL	Polikaprolakton
PVA	Polivinilalkol
QS	Quorum Sensing
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi (Scanning electron microscopy)
SP	Serratiopeptidaz
spp.	Tür (Species)
SS	Standart sapma
tntc	too numerous to count

TSA	Triptik soy agar
USP	Amerikan Farmakopesi (United State Pharmacopoeia)
UV	Mor ötesi (Ultraviolet)
VA	Vankomisin hidroklorür
VK	Varyasyon katsayısı
X	Ortalama
Λ_{\max}	Maksimum dalga boyu

ŞEKİLLER

ŞEKİL		SAYFA
Şekil 2.1.	Bazı metalik implantlar (Kırık plakları, teller, iğneler, vidalar)	6
Şekil 2.2.	A: Çocukluk dönemindeki normal tibia ve fibula görüntüsü, B: Çocukluk döneminde septik osteomyelit nedeni ile tibiada kayıp ve dengeleyici olarak fibulada kalınlaşma	10
Şekil 2.3.	Biyofilm oluşum basamakları: 1) mikroorganizmaların yüzeye tutunması, 2) mikroorganizmaların yüzeye geri dönüşümsüz tutunması ve çoğalma 3) biyofilmin olgunlaşması, 4) hücre ölümleri ve dağılma	16
Şekil 2.4.	Biyofilm oluşumunda bakterilerin sinyal molekülü ile iletişimi	17
Şekil 2.5.	Çoklu emülsiyon oluşturma – çözücü buharlaştırma yönteminin şematik gösterimi	27
Şekil 2.6.	Polisakkaritlerin su içerisinde jelleşme mekanizması. A: Gelişigüzel sarmallar (random coil), B: Heliks şekline dönüşmesi, C: Heliks yapısının son aşamada jelin kavşak bölgelerini oluşturacak şekilde agregasyonu	31
Şekil 2.7.	Blok kopolimer çözeltisindeki kritik misel konsantrasyonunun (cmc) ve kritik jel konsantrasyonunun (cgc) şematik gösterimi	33
Şekil 2.8.	Vankomisin molekül formülü	36
Şekil 3.1.	Emülsifikasyon/Çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının üretim şeması	50

Şekil 3.2.	İlaç yüklü steril jel formülasyonlarının in vitro salım çalışmalarında kullanılan düzeneğin şematik görünümü.	60
Şekil 3.3.	Mikrotitrasyon plağı kuyucuklarında biyofilm oluşturulmasının şematik gösterimi	64
Şekil 4.1.	Vankomisin HCl'nin UV spektrumu (distile su içinde çözülmüş, 200 µg/ml konsantrasyonda)	72
Şekil 4.2.	VA'nın FT-IR spektrumu	74
Şekil 4.3.	Vankomisin HCl'nin DSC termogramı	75
Şekil 4.4.	Vankomisin HCl'ün HPLC kromatogramı (distile su içinde çözülmüş, 200 µg/ml konsantrasyonda)	76
Şekil 4.5.	Vankomisin HCl'nin kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (n=6)	77
Şekil 4.6.	Analitik yöntem validasyonunda özgünlük bulguları (A:kitosan, B:Pluronic, C:boş PCL mikroküre, D:vankomisin HCl, E:serratiopeptidaz)	79
Şekil 4.7.	Serratiopeptidazın pH 7,4 PBS tamponu içerisindeki UV spektrumu	81
Şekil 4.8.	Serratiopeptidazın FT-IR spektrumu	83
Şekil 4.9.	Serratiopeptidazın DSC termogramı	84
Şekil 4.10.	Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü ve boş mikroküre formülasyonlarına ait SEM görüntüleri (A,B: F1 formülasyonu, C,D: F3 formülasyonu, E,F: F5 formülasyonu)	85
Şekil 4.11.	Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü ve boş mikroküre formülasyonlarına ait SEM görüntüleri (G,H: F6 formülasyonu, I,J: F7 formülasyonu, K,L: F8 formülasyonu)	86

- Şekil 4.12. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü ve boş mikroküre formülasyonlarına ait SEM görüntüleri 87
(M: F3 formülasyonunun iç yapısı, N: F6 formülasyonunun iç yapısı, O: F8 formülasyonunun iç yapısı, P: Boş F1 formülasyonu, R: Boş F3 formülasyonu)
- Şekil 4.13 Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü ve boş mikroküre formülasyonlarına ait SEM görüntüleri 88
(S: Boş F5 formülasyonu, T: Boş F6 formülasyonu, U: Boş F7 formülasyonu, V: Boş F8 formülasyonu)
- Şekil 4.14. Mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı grafikleri A) F1, B)F3, C)F5, D)F6, E)F7, F)F8 Formülasyonu 90
- Şekil 4.15. A:VA'nın FTIR spektrumu, B: Yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanmış boş mikroküre, C: VA yüklü mikroküre 93
- Şekil 4.16. Saf VA, boş F8 mikroküresi ve F8 mikroküresinin DSC termogramı 94
- Şekil 4.17. Farklı molekül ağırlığına sahip PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerden zamana karşı vankomisin HCl salım profilleri (n=6) 96
- Şekil 4.18. Farklı molekül ağırlığına sahip PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerden zamana karşı vankomisin HCl salım profilleri (n=6) 96
A: İç fazında %0,05 PVA içeren mikroküre formülasyonları B: İç fazında %0,1 PVA içeren mikroküre formülasyonları
- Şekil 4.19. Saf VA (A) ve mikrokürelerden salınan VA'ya ait (B) 97

	HPLC pikleri	
Şekil 4.20.	Yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin A: sterilizasyon öncesi, B: sterilizasyon sonrası FTIR spektrumları	99
Şekil 4.21.	F8 formülasyon kodlu mikroküreye ait sterilizasyon öncesi ve sonrası DSC termogramları	100
Şekil 4.22.	Hazırlanan mikroküre formülasyonlarının sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri (A,B: F1 formülasyonu, C,D: F3 formülasyonu, E,F: F5 formülasyonu,)	101
Şekil 4.23.	Hazırlanan mikroküre formülasyonlarının sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri (G,H: F6 formülasyonu, I,J: F7 formülasyonu, K,L: F8 formülasyonu)	102
Şekil 4.24.	Hazırlanan mikroküre formülasyonlarının sterilizasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (A: F1 formülasyonu, B: Sterilizasyon sonrası F1 formülasyonu, C: F3 formülasyonu, D: Sterilizasyon sonrası F3 formülasyonu, E: F5 formülasyonu, F: Sterilizasyon sonrası F5 formülasyonu,)	103
Şekil 4.25.	Hazırlanan mikroküre formülasyonlarının sterilizasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (G: F6 formülasyonu, H: Sterilizasyon sonrası F6 formülasyonu I: F7 formülasyonu, J: Sterilizasyon sonrası F7 formülasyonu, K: F8 formülasyonu, L: Sterilizasyon sonrası F8 formülasyonu)	104
Şekil 4.26.	A: Sterilizasyon öncesi, B: Sterilizasyon sonrası farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerden zamana karşı vankomisin HCl salımı profili	108
Şekil 4.27.	Saf Vankomisin HCl'e ilişkin pik	109
Şekil 4.28.	Salım sonrası Vankomisin HCl'e pik	109
Şekil 4.29.	Sterilizasyon öncesi termosensitif kitosan jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği	111
Şekil 4.30.	Sterilizasyon öncesi termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği	112

Şekil 4.31.	Sterilizasyon sonrası termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği	113
Şekil 4.32.	Sterilizasyon sonrası SP içeren termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği	114
Şekil 4.33.	Sterilizasyon sonrası VA içeren termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği	115
Şekil 4.34.	Sterilizasyon sonrası VA, SP ve VA yüklü mikroküre içeren termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği	116
Şekil 4.35.	İlaç yüklü steril jel formülasyonlarından VA salımı	118
Şekil 4.36.	İlaç yüklü steril pluronik jel formülasyonlarından VA salımı	121
Şekil 4.37.	İlaç içeren steril pluronik jel formülasyonlarından elde edilen salım numuneleri üzerinde yapılan serratiopeptidaz aktivitesi deney sonuçları (n=6)	122
Şekil 4.38.	Mikrotitrasyon plağı kuyucukları içerisinde oluşmuş biyofilm tabakası (A: SP uygulanmamış, B: SP uygulanmış)	123
Şekil 4.39.	SP ve VA içeren PBS pH 7,4 çözeltileri ile muamele sonrasında biyofilm oluşturan <i>S. epidermidis</i> bakterilerine ait koloniler	124
Şekil 4.40.	Steril Sonuç jel formülasyonuna ait DSC termogramı	128
Şekil 4.41.	JP8 jel formülasyonundan Zamana karşı % Kümülatif VA Salım profili	129
Şekil 4.42.	Sonuç jel formülasyonlarından elde edilen salım numuneleri üzerinde yapılan serratiopeptidaz aktivitesi deney sonuçları (n=6)	130
Şekil 4.43.	Sonuç jel formülasyonundan zamana karşı % Kümülatif SP salımı profili	131

Şekil 4.45.	Cerrahi işlem öncesi hazırlanan biyofilm kaplı implant yüzeyi	133
Şekil 4.46.	Ötenazi işlemi takiben cerrahi müdahalenin yapıldığı bölgenin görüntüsü A: Osteomyelit grubu, B: Tedavi grubu	134
Şekil 4.47.	A1 (X 200),A2 (X 6000),A3 (X 25000): Osteomyelit Grubu tavşandan çıkarılan implantın SEM görüntüsü	135
Şekil 4.48.	B1 (X 200), B2 (X 6000), B3 (X 25000): Tedavi Grubu 1 No'lu tavşandan çıkarılan implantın SEM görüntüsü	136
Şekil 4.49.	C1 (X 200), C2 (X 6000), C3 (X 25000): Tedavi Grubu 2 No'lu tavşandan çıkarılan implantın SEM görüntüsü	137

TABLOLAR

TABLO		SAYFA
Tablo 2.1.	Literatürde ortopedi alanında sıklıkla kullanılan biyomateryaller	7
Tablo 2.2.	Mikroküre formülasyonlarında kullanılan biyoparçalanır polimerler	23
Tablo 2.3.	Mikroküre formülasyonlarında kullanılan biyolojik olarak parçalanmayan polimerler	23
Tablo 2.4.	Ortopedi alanında kullanılan bazı biyoparçalanır polimerler ve kullanım alanlarına dair örnekler	24
Tablo 3.1.	Vankomisin HCl'ün miktar tayininde kullanılan HPLC koşulları	43
Tablo 3.2.	HPLC yönteminde mobil faz olarak kullanılan çözeltilerin akış şeması	44
Tablo 3.3.	Boş PCL Mw 14000 mikrokürelerde partikül büyüklüğünün ayarlanması için yapılan çalışmalar	49
Tablo 3.4.	VA yüklü PCL mikrokürelerinin ön formülasyon çalışmalarına ilişkin bilgiler	51
Tablo 3.5.	Salım deneylerinde kullanılan steril jel formülasyonlarına ilişkin bilgiler	61
Tablo 3.6.	Antibiyofilm aktivitesinin gösterilmesi için ön çalışmalarda kullanılan çözelti formülasyonları	65
Tablo 3.7.	İn vitro antibiyofilm aktivite testinin yapıldığı steril ilaç yüklü jel formülasyonları	66
Tablo 3.8.	Pilot çalışmalar sonrası yapılacak olan in vivo çalışmalar için belirlenen deney grupları	70
Tablo 4.1.	Tekrarlanabilirlik sonuçları (n=6)	78
Tablo 4.2.	Tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)	78
Tablo 4.3.	Analitik yöntem validasyonunda VA'ya ilişkin stabilite sonuçları (n=6)	80

Tablo 4.4.	Farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin partikül büyüklüğü değerleri	89
Tablo 4.5.	Farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin üretim verimi değerleri (n=3)	91
Tablo 4.6.	Farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin VA yükleme etkinliği değerleri (n=3)	92
Tablo 4.7.	Mikroküre formülasyonlarının salım kinetiklerinin değerlendirilmesine ilişkin veriler	95
Tablo 4.8.	Sterilizasyon sonrası farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan, farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin partikül büyüklüğü değerleri (n=3)	105
Tablo 4.9.	Sterilizasyon sonrası farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin yükleme etkinliği değerleri	106
Tablo 4.10.	Sterilizasyon öncesi kitosan jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)	111
Tablo 4.11.	Sterilizasyon öncesi pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)	112
Tablo 4.12	Sterilizasyon sonrası pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)	113
Tablo 4.13.	Sterilizasyon sonrası SP içeren pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)	114
Tablo 4.14.	Sterilizasyon sonrası VA içeren pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)	115
Tablo 4.15.	Sterilizasyon sonrası VA, SP ve VA yüklü mikroküre içeren pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)	116
Tablo 4.16.	Jel formülasyonlarından zamana karşı % Kümülatif VA salım değerleri	118

Tablo 4.17.	Pluronik jel formülasyonlarından zamana karşı % Kümülatif VA salım değerleri	120
Tablo 4.18.	SP ve VA içeren PBS pH 7,4 çözeltilerinin içerikleri antibiyofilm aktivitesi sonuçları	125
Tablo 4.19.	Biyofilm tabakası üzerine yerleştirilen ilaçlı steril jel formülasyonları ve inkübasyon sonucunda üreyen koloni sayıları	126
Tablo 4.20.	Salım numunelerinin MİK değerleri	131
Tablo 4.21.	Biyofilm tabakası üzerine yerleştirilen salım numunelerinin inkübasyon sonucunda üreyen koloni sayıları	132

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Osteomyelit, kısaca kemik veya kemik iliği enfeksiyonu olarak tanımlanabilir. Enfeksiyona neden olan mikroorganizmalar genellikle kan dolaşımı, çevre doku enfeksiyonları, travma veya medikal cihazlar yolu ile kemiğe taşınmaktadır. Cerrahi tekniklerdeki ilerlemeler ve aseptik işlemlerin sıkı bir şekilde uygulanmasına rağmen, implantasyon işlemi sırasında meydana gelen doku hasarı ve enflamasyon, cihaz disfonksiyonu ve sistemik enfeksiyonlar nedeniyle medikal cihaz kaynaklı osteomyelit sıklıkla ortaya çıkmaktadır. Medikal cihaz kaynaklı osteomyelit, kemik nekrozu, zayıf vasküler perfüzyon ve buna bağlı olarak enfekte dokuda iyileşmenin yavaş olması nedenleriyle tedavisi güç, zaman alıcı ve pahalı bir hastalıktır. Buna ilaveten, medikal cihazlar biyofilm oluşturmaları için bakterilere uygun bir ortam sağlamaktadırlar. Medikal cihaz üzerinde oluşan biyofilm kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç göstermekte ve antibiyotiğin enfekte olan dokuya yetersiz veya gecikmiş penetrasyonuna neden olarak tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır.

Günümüzde, biyofilm-bazlı medikal cihaz kaynaklı (BBMCK) osteomyelitin tedavisi için uygulanan yaklaşım, öncelikle medikal cihazın cerrahi bir işlem ile çıkarılması ve 4-6 hafta veya daha uzun süreyle yüksek dozda sistemik antibiyotik uygulanması şeklindedir. Ancak bu uygulama, hastada yan etkilerin ortaya çıkmasına ve uyuncun azalmasına neden olmaktadır. Zira sistemik tedaviyi takiben yeni bir cerrahi işlem ile tekrar medikal cihaz implantasyonu yapılarak tedavi tamamlanmaktadır. İki kez cerrahi işleme ve uzun süren sistemik antibiyotik tedavisine maruz kalmak pekçok hastada yan etkilere, özellikle yaşlı hastalarda ilave başka komplikasyonların gelişmesine, iş gücü ve yaşam kalitesi kaybına, ayrıca, tedavinin yüksek tutarı nedeniyle sağlık sisteminde ekonomik kayıplara da yol açmaktadır. Bu durumda, sözkonusu faktörler de göz önüne alındığında klinikte, cerrahi işleme gerek duyulmadan enjeksiyon yolu ile enfeksiyonun olduğu bölgeye uygulanabilecek ve lokal olarak istenen miktarda ve kontrollü ilaç salımı sağlayacak başarılı tedavi sistemlerine ihtiyaç duyulduğu aşikardır.

Termosensitif jeller herhangi bir cerrahi işleme gerek duyulmadan istenen bölgeye enjeksiyon yolu ile uygulanabilen ve yüksek ilaç yükleme kapasitesi,

kontrollü ilaç salımı sağlamaları gibi üstünlüklere sahip olan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Ayrıca, termosensitif jellere ilaç yanında mikroküre, nanopartikül gibi ilaç taşıyıcı sistemler de yüklenerek daha uzun süreli ve kontrollü ilaç salımı sağlayan formülasyonlar hazırlanabilmekte ve partiküler sistemlerin sakıncalarından olan patlama etkisi (“burst effect”) ile ilaç salımı problemi engellenmektedir.

Enfeksiyon tedavisinde, biyofilmler, konakçının immün sistemine karşı direnç oluşturarak ve ilaç penetrasyonunu engellemek suretiyle uygulanan antibiyotikleri neredeyse etkisiz kılabilirler. Literatür bilgileri ve klinik verilere göre, osteomyelit tedavisinde uzun zamandır ilk sırada kullanılan ve tedaviye iyi sonuç veren vankomisin gibi glikopeptid yapıda, gram(+) bakterilere karşı etkili antibiyotikler, BBMCK osteomyelitin tedavisinde oluşan direnç ve ilaç penetrasyonunun engellenmesi nedeniyle istenen/beklenen düzeyde etkin sonuçlar verememektedir. Literatürde, biyofilmin yok edilmesi için sadece proteolitik enzimlerin kullanıldığı veya BBMCK osteomyelitin tedavisi için sadece farklı antibiyotik veya kombinasyonlarının kullanıldığı az sayıda çalışma yer almakta ve bu çalışmalarda tedavide başarıya ulaşılması için daha etkin ve farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir. Ayrıca, bu çalışmaların incelenmesi sonucunda, *in vitro* olarak biyofilm oluşturulmasında denenen yöntemlerin iyileştirilmesine ve biyofilmin parçalanması ve ilaç penetrasyonunun değerlendirilmesi gereken mekanizmaların daha ileri düzeyde araştırılmasına ihtiyaç duyulduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, BBMCK osteomyelitte daha etkin tedavi sağlamak üzere;

- a) biyofilmin parçalanması ve etki bölgesinde hem ani, hem uzun süreli antibiyotik salımının sağlanmasının aynı anda gerçekleştirilebilmesi için;
 - biyofilmi parçalama potansiyeli olan serratiopeptidaz enzimini dayanıklı ve etkin bir şekilde taşıyacak ve kontrollü salımını sağlayacak,
 - antibiyotiği (vankomisin HCl) serbest (ani etki) ve polimerik mikroküreye yüklü (uzun süreli etki) halde, dayanıklı ve biyoaktif olarak taşıyacak ve kontrollü salımını sağlayacak,
 - mikroküre hazırlamada uzun süre ilaç salımı sağlamaları ve parçalanma ürünlerinin asidik olmaması nedeni ile kemik için uygun olan

biyoparçalanır ve biyoyeçimli polimerlerden poli(ϵ -kaprolakton)'u içerecek,

- enzim ve antibiyotiğin kendi aralarında ve kullanılan polimer gibi yardımcı maddeler ile etkileşmeden, dayanıklı ve biyoaktif bir şekilde salımını sağlayacak,

termosensitif jel formülasyonlarının tasarımı ve *in vitro* karakterizasyonu,

- b) *in vitro* olarak biyofilm modelinin oluşturulması ve antibiyotik penetrasyonunun ve formülasyonların ve sadece serratiopeptidaz içeren jel formülasyonlarının etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi,
- c) seçilen formülasyonların etkinliklerinin değerlendirilmesi olarak belirlenmiştir.

Bu amaçla, tezimizde belirtilen gerekçelerle formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve serratiopeptidazın biyofilmi parçalama üzerindeki etkinliği mikrobiyolojik yöntemler yardımıyla da irdelenmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tıbbi Cihazlar

Tıbbi cihaz (Medikal cihaz), 9 Ocak 2007 tarihli Resmi Gazete’de Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan Tıbbi Cihaz Yönetmeliği’ne göre; insanda kullanıldıklarında aslı fonksiyonunu farmakolojik, immünolojik veya metabolik etkiler ile sağlamayan, fakat fonksiyonunu yerine getirirken bu etkiler tarafından desteklenebilen ve insan üzerinde:

- 1) hastalığın tanısı, önlenmesi, izlenmesi, tedavisi veya hafifletilmesi,
- 2) yaralanma veya sakatlığın tanısı, izlenmesi, tedavisi, hafifletilmesi veya mağduriyetin giderilmesi,
- 3) anatomik veya fizyolojik bir işlevin araştırılması, değiştirilmesi veya yerine başka bir şey konulması,
- 4) doğum kontrolü veya sadece ilaç uygulanması

amacıyla imal edilmiş, tek başına veya birlikte kullanılabilen, amaçlanan işlevini yerine getirebilmesi için gerekiyorsa bilgisayar yazılımı ile de kullanılan ve cansız hayvanların dokularından da elde edilen ürünler dahil olmak üzere, her türlü araç, alet, cihaz, aksesuar veya diğer malzemeleri ifade etmektedir (1) .

2.1.1. Ortopedide Kullanılan Tıbbi Cihazlar

Biyomateryal, tedavi etmek, düzeltmek veya insan vücudunun anatomik yapılarının yerini almak amacı ile insan doku ve sıvıları ile temas halinde bulunan malzemedir. Sayısız ortopedik uygulama amacı ile üretilen ortopedik alanda kullanılan biyomateryal cihazlar, yaygın olarak implant olarak adlandırılmaktadır (2)

Rekonstrüktif implantlar, kırık sabitleme ürünleri, spinal ürünler, rehabilitasyon ürünleri, artroskopi ürünleri, elektriksel uyarı ürünleri ve kalıp (casting) ürünlerini içeren ortopedik biyomateryaller, hareketliliğin ve her yıl milyonlarca bireyin yaşam kalitesinin yeniden sağlanmasında son derece büyük bir öneme ve başarıya sahiptir. Bu ürünler, genel olarak, ya kırıkların sabitlenmesinde ya da eklem replasman

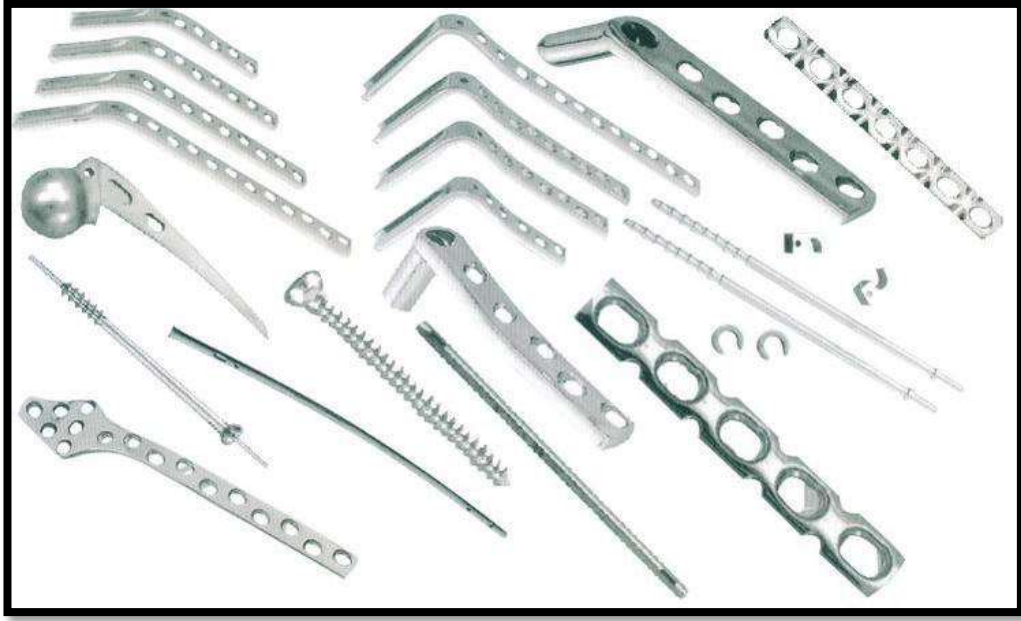
tedavisinde kullanılmaktadır. Bu iki kategorinin daha ayrıntılı ortopedik uygulamaları şu şekilde listelenebilir (3) :

1. Kırık Sabitleme Cihazları

- Spinal sabitleme cihazları
- Kırık plakaları
- Teller, iğneler, vidalar
- İntramedular cihazlar
- Yapay ligamentler

2. Eklem Replasmanı

- Kalça artoplastisi
- Diz artoplastisi
- Topuk artoplastisi
- Omuz artoplastisi
- Dirsek artoplastisi
- El bileği artoplastisi
- Parmak artoplastisi



Şekil 2.1. Bazı metalik implantlar (Kırık plakları, teller, iğneler, vidalar) (4)
(alıntılanma tarihi 24.11.2012)

2.1.1.1.Ortopedik Biyomateryallerin Özellikleri ve Materyal Tipleri

Biyomateryallerin doğaları, yapısal düzenleri, ve genel özellikleri ile birlikte insan vücudunun yumuşak ve sert dokuları, kan ve hücre içi – hücreler arası sıvıları ile etkileşimlerinin anlaşılması, ortopedik operasyonlar için büyük önem taşımaktadır. Ortopedik biyomateryaller, metaller, polimerler ve seramikler olmak üzere üç büyük malzeme tipini içeren ve genellikle döngüsel yükleme-taşıma uygulamalarına karşı koyabilen malzemeler ile sınırlıdır. Bu kimyasal bileşikler yararlı malzeme özelliklerine sahip olmalarına rağmen, polimerlerin düşük sağlamlığı, seramiklerin kırılmalara karşı düşük dayanıklılıkları ve metallerin korozyona eğilimleri ve kimyasal reaktiflikleri gibi her malzeme pek çok eksikliği de beraberinde getirmektedir. Genel olarak ortopedik tasarımlarda en önemli malzeme özellikleri şu şekilde sıralanabilir (2,5) :

- Biyouyumluluk
- Gerilime karşı dayanıklılık
- Dayanıklılık (kırılmalara karşı dayanıklılık, mekanik aşınma direnci)
- Kimyasal aşınma direnci

- Esneklik

Biyomalzemelerin genel özelliklerinin, kullanımlarının ve kısıtlamalarının bilinmesi, implant malzemesinin performansının artırılması için nelerin gerektiğinin ve endüstriye sadece birkaç malzemenin hakim olma nedenlerinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır. En yaygın olarak kullanılan ortopedik biyomalzemeler ve birincil kullanım alanları Tablo 1’de gösterilmektedir(6) .

Tablo 2.1. Literatürde ortopedi alanında sıklıkla kullanılan biyomateryaller (6)

Malzeme	Birincil Kullanım Alanı
Metaller	
Titanyum (Ti) ve Ti alaşımları	Plaka, vida, Total Eklem Artroplastisi (TEA) bileşenlerinin yük taşımayan yüzeyleri
Kobalt-Krom-Molibden (Co-Cr-Mo) alaşımları	Yük taşıyan yüzeylerin de dahil olduğu TEA bileşenleri
Paslanmaz çelik alaşımları	Tel, iğne, vida, plaka, kablolama
Polimerler	
Ultra yüksek molekül ağırlıklı polietilen (UHMWPE)	TEA’da yük taşıyan yüzeylerin düşük sürtünmeli ekleri
Polimetilmetakrilat (PMMA)	Kemik çimentoları
Seramikler	
Alumina	TEA bileşenlerinin yük taşıyan yüzeyleri
Zirkonya	TEA bileşenlerinin yük taşıyan yüzeyleri

2.1.1.1.1. Metaller

Metaller, 17. Yüzyıldan bugüne kadar terapötik uygulamalarda kullanılmaktadır. 18. Yüzyılda ilk defa metal vida ortopedik uygulamalarda kullanılmıştır (2) . Kimyasal aşınmaya dayanma, gerilme direnci, sertlik, uzun yorulma ömrü, kırılmaya dayanma ve biyouyumluluk gibi malzeme özellikleri ile metaller, ortopedik tıbbi cihazlar için çok uygun bileşenlerdir. Metal alaşımlarının

yükleme-taşıma implant malzemeleri olarak geniş çaplı kullanımına neden olan en önemli özelliği, gerilime ve kimyasal aşınmaya karşı dayanıklılıklardır (6) . Özellikle total eklem replasmanında tercih edilen, titanyum esaslı alaşımlar, kobalt esaslı alaşımlar ve paslanmaz çelik alaşımlar olmak üzere ortopedide kullanılan başlıca üç metal alaşımı vardır (5) .

2.1.1.1.2. Polimerler

Ortopedide kullanılan en düşük gerilim dayanıklılığına sahip; ancak çok esnek ve uyumlu malzemelerdir. Yüklemeye altında kayma ve viskoelastisite özellikleri polimerleri implant materyali olarak eşsiz bir konuma getirmektedir (5) . Polimerler, yaygın olarak, eklem replasmanlarının yüzeylerinin eklemleştirilmesinde ve çimento malzemelerinin kemik ile implant yüzeylerinin ara yüzeylerinde kullanılmaktadır(6) .

2.1.1.1.3. Seramikler

Seramik, polikristal yapıda malzemedir. Seramik malzemelerin en önemli özellikleri, sertlikleri ve kırılma dayanıklılıklarıdır (2) . Yük taşıyan yüzeylerde, metal-metal veya metal polimer yüzeylere oranla çok daha yüksek dayanıklılığa sahip olmakla birlikte, oksidasyona karşı dayanıklılıkları vücut ile inert bir özellik göstermelerini sağlamaktadır (5) .

2.2. Osteomiyelit

2.2.1. Kemik

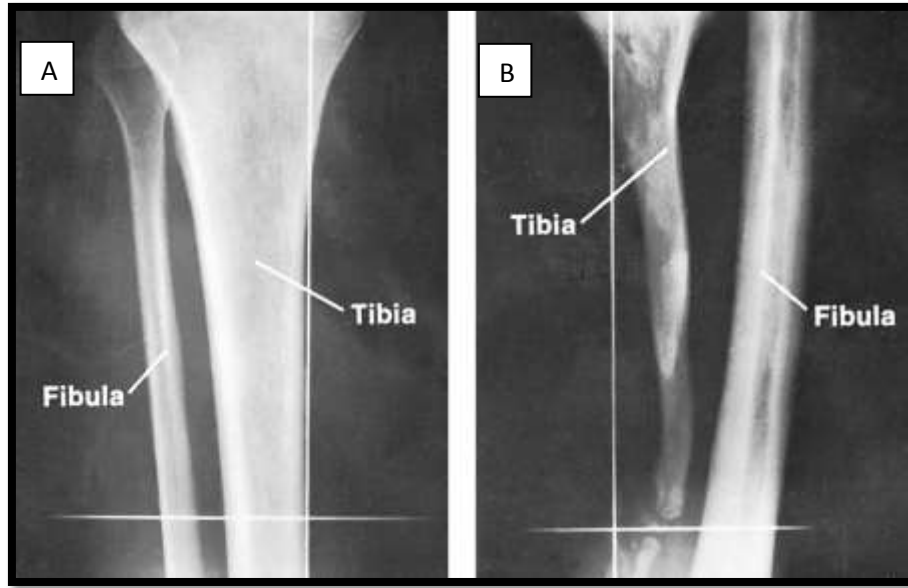
Kemik, matriks oluşturucu osteoblast ve kemik matriksini tekrar emen osteoklastların etkisine karşı eklem tarafından kontrol edilen bir süreç ile sürekli olarak yeniden yapılanan, lif ile desteklenmiş kireçlenmiş (calcified) bir dokudur (7) . Kemik; ekstremiteler ve hayati organları içinde bulunduran, vücut boşlukları için sert destek yapı oluşturan, kaslara tutunacak yer ve hareketi sağlayan, hematopoetik

dokuyu saran, kalsiyum, magnezyum, sodyum, fosfor gibi iyonlar için depo görevi gören, sert bir dokudur (8) . Kemikler, oldukça sert yapılardır ve fonksiyonlarına göre değişen şekillere sahiptirler. Metabolizmaları birincil olarak endokrin, immün ve nörovasküler sistem ile kontrol edilir, iç ve dış uyarılara verdikleri yanıtlar halen tam olarak belirlenememiştir (9) .

2.2.2. Osteomyelit Tanım

Osteomyelit; bir mikroorganizmanın enfeksiyöz ve inflamatuvar süreçler ile kemik dokuda hasar yaratması sonucu ortaya çıkan ilerleyici karakterde bir hastalıktır. Kemiğin sadece bir bölümü tutulabildiği gibi medüller kanal, periost, korteks ve çevre yumuşak dokuların tümü bu tabloya katılabilmektedir (10) .

Osteomyelitte, kemik dokusunun harabiyetinden, bakterinin salgıladığı endotoksinlerin yaptığı hasar (bakteriyel lipopolisakkarit), bakterinin osteoklastik aktiviteyi tetiklemesi ve kemik matriks sentezinin engellenmesi olmak üzere üç mekanizma sorumlu tutulmaktadır (7) . Enfeksiyon sırasında, fagositler, istilacı mikroorganizmaları kendi içlerine alma girişiminde bulunurlar ve bu süreç, toksik oksijen radikallerinin oluşmasına ve çevre dokuyu sindiren proteolitik enzimlerin salınmasına neden olur. Pek çok bakteriyel bileşen, direk veya indirek olarak kemik değiştirici faktörler olarak etki ederler. Kemik kırılmasına yanıt olarak üretilen güçlü osteoklast antagonisti Prostaglandin E₂ gibi araşidonik asit metabolitlerinin bulunması, enfeksiyon oluşumu için gerekli olan bakteri miktarını azaltmaktadır (11)



Şekil 2.2. A: Çocukluk dönemindeki normal tibia ve fibula görüntüsü, B: Çocukluk döneminde septik osteomyelit nedeni ile tibiada kayıp ve dengeleyici olarak fibulada kalınlaşma (12)

2.2.3. Osteomyelit Etiyolojisi

Osteomyelit, çoğu zaman bakteriyel kökenli olup, hematogen yayılım ile oluşan osteomyelit ve bulaşma ile oluşan osteomyelit (cerrahi, travma, komşu enfeksiyon odağı) olmak üzere genel olarak iki oluşum şekli vardır (10) .

Kan dolaşımından bakterinin kemiğe yerleşmesi ile gelişen hematogen osteomyelit, osteomyelit vakalarının %20'sini oluşturmaktadır. Kandaki bir bakteri türünün direk olarak kemiğe yerleşmesi ile gelişen birincil hematogen osteomyelit, yetişkin popülasyonda da rastlanmasına rağmen bebek ve çocuklarda yaygın olarak görülmektedir. Yetişkinlerde görülen hematogen osteomyelit, genellikle, bakteri türünün kan dolaşımına geçmesi ve distal kemik ve kemik iliğine yerleşmesi ile gelişen ikincil enfeksiyon ile oluşmaktadır (13) . Akut hematogen osteomyelit, hastanın yaşına bağlı olarak farklı klinik özellikler göstermekte, bu nedenle, bebeklerin, çocukların ve yetişkinlerin osteomyelitleri, genel veya septisemik faz olmak üzere birkaç ortak özelliği olan üç farklı klinik oluşum göstermektedir (14) .

Akut osteomyelit, birkaç gün veya birkaç haftalık bir süre boyunca gelişmekte ve tek başına antibiyotik tedavisi ile iyileştirilebilmektedir. Kronik

osteomyelit ise, aylar veya yılar boyu gelişebilen ve düşük dereceli enflamasyon, nekrozlu kemik dokusu, ve nekroze kemik dokuya reaksiyon olarak yeni kemik eklemesi ve bursal yolların oluşumu ile kötüye giden ve dirençli bir enfeksiyondur. Kronik kemik enfeksiyonu ile ilgili en önemli nokta, etiyolojik ajanın ve hastaya uygun tedavinin doğru olarak saptanmasının zorluğudur (15) .

2.2.4. Osteomyelit Etkenleri

Hematojen osteomyelit, genellikle monomikrobiyotik yani tek tür bakteri kaynaklı olmaktadır, polimikrobiyal hematojen osteomyelite çok nadir rastlanmaktadır. Bebeklerde enfekte kemik bölgesinden en sık izole edilen bakteri türleri, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Escherichia coli* olurken; çocuklarda *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ve *Haemophilus influenzae* 'ya sıkça rastlanmaktadır. Yetişkinlerde ise, *Staphylococcus aureus* en yaygın rastlanan hematojen osteomyelit etkenidir. Bunların dışında, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Mycobacterium* spp., ayrıca anaerobik bakteriler ve fungal türler (özellikle *Candida* spp.) gibi diğer bazı patojenik mikroorganizmalar da osteomyelit etkeni olabilmektedir (13) .

Hematojen osteomyelitinin aksine, komşu odaklı osteomyelite, enfekte kemikten, *Staphylococcus aureus* ve koagülaz-negatif stafilokok izolatlarının %75'ini oluşturduğu stafilokokların çoğunlukta olduğu birden fazla patojenik tür izole edilmektedir. Bununla beraber gram-negatif basil ve anaerobik organizmalar da izole edilebilmektedir. Enfeksiyon genellikle, travma, ameliyat veya yumuşak doku enfeksiyonu yolu ile organizmanın inokülasyonu sonrası bir ay içerisinde gelişmektedir (16) .

2.2.4.1. Tıbbi Cihaz Kaynaklı Osteomyelit

Cerrahi tekniklerdeki ilerlemeler ve aseptik işlemlerin sıkı bir şekilde uygulanmasına rağmen;

- implantasyon işlemi sırasında meydana gelen doku hasarı ve enflamasyon,
- cihaz disfonksiyonu,
- sistemik enfeksiyonlar

nedenleri ile tıbbi cihaz kaynaklı osteomyelit sıklıkla ortaya çıkmaktadır (17) .

İmplant kaynaklı osteomyelit; yabancı materyal yüzeyine bakteri yapışması, antibiyotiklerin enfekte kemiğe yetersiz dağılımı, kemik nekrozu, zayıf vasküler perfüzyon ve buna bağlı olarak enfekte dokuda iyileşmenin yavaş olması sebepleri ile tedavisi oldukça güç bir enfeksiyondur (17) .

2.2.5. Osteomyelitte Tedavi Yaklaşımları

Osteomyelitte tedavinin ana prensipleri radikal bir şekilde nekrotik dokuların temizlenmesi, ölü boşlukların doldurulması ve uzun süreli etkin antibiyoterapidir (10) .

Antibiyotik tedavisi, osteomyelitli dokunun tedavisinde önemli bir aşama olup, antibiyograma göre uygulanmalıdır. Antibiyotik uygulanması için, pek çok hekimin tercih ettiği 6 ila 24 hafta arasında uygulama süresi gerektiren sistemik yol ile antibiyotiğin yavaş salımına olanak veren taşıyıcıların hasarlı bölgeye direkt uygulanması ile sağlanan direkt yol olmak üzere iki çeşit yaklaşım bulunmaktadır (18) . Travma, ameliyat veya implantasyon yolu ile gelen bakteri kaynaklı kemik enfeksiyonu (osteomyelit), ciddi ve hayati tehlike oluşturabilen bir vakadır. Antibiyotiklerin enfekte olan iskelet dokusundaki sınırlı kan akımı nedeni ile bölgede düşük dağılımları ve implant yüzeyinde patojenlerin gelişmesi ile oluşan biyofilme doğrudan ulaşmadaki yetersizlikleri, osteomyelit tedavisini güçleştiren en önemli nedenlerdir. Dokuya ve biyofilme yeterli antibiyotik penetrasyonunun sağlanması için yüksek sistemik antibiyotik doz uygulanması, olası toksik yan etkileri nedeni ile tercih edilmemektedir (19) . Lokal antibiyotik salım sistemi uygulanması, sistemik yan etki riskini düşürerek, parenteral antibiyotik uygulamasından daha yüksek konsantrasyonda antibiyotiğin doğrudan bölgeye uygulanmasını sağlamaktadır. Yerleştirilen materyalin ikinci bir ameliyat prosedürü ile tekrar çıkarılması gereğinin

önüne geçilmesi açısından, uygulama sırasında kullanılan sistemlerin biyoparçalanabilir sistemler olması, bu sistemlerin tercih edilmesine neden olmaktadır (20) .

Genellikle tıbbi cihaz kaynaklı osteomyelit, sklerotik damarsız kemik tarafından çevrelenen nekrotik kemik dokusu ile karakterize olduğundan antibiyotiğin bu bölgeye ulaşması oldukça zordur. Bu nedenle, tıbbi cihaz kaynaklı osteomyelit tedavisinde sadece sistemik antibiyotik tedavisi ile tatmin edici sonuçlar elde edilemeyebilir. Bu problemin aşılması için literatürde ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak antibiyotiklerin istenen düzeyde, lokal ve kontrollü taşınmasının sağlanması amacıyla çalışmalar yapılmış ve osteomyelit tedavisinde ümit verici sonuçların alındığı bildirilmiştir (21-23) . Buna ilaveten, tıbbi cihazlar biyofilm oluşturmaları için bakterilere uygun bir ortam sağlamaktadırlar. Tıbbi cihaz üzerinde oluşan biyofilm kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç göstermekte ve antibiyotiğin enfekte olan dokuya yetersiz veya gecikmiş penetrasyonuna neden olarak tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır. Son zamanlarda, literatürde bu problemin aşılması için de antibiyotik-antibiyotik, antibiyotik-antifungal ilaç veya antibiyotik-biyofilm matriksini parçalayan ilaç kombinasyonları içeren taşıyıcı sistemler ile biyofilm-bazlı tıbbi cihaz kaynaklı (BBMCK) osteomyelitin tedavisine yönelik çalışmalara rastlanmaktadır. Ayrıca literatürde biyofilmin aşılması için gelecekte yeni madde kombinasyonları ve ilaç taşıyıcı sistemlerin araştırılması gerekliliğinden söz edilmektedir (24) . Antibakteriyellere ve konak savunmasına karşı direnç gelişimi bakımından biyofilm gelişiminin en tehlikeli özelliği glikokaliks yapısının oluşumudur. Bu durum, postoperatif enfeksiyonların tedavisi için yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine neden olmuştur. Bu yaklaşımlardan biri de, proteolitik enzimler kullanarak antibiyotiklerin bakteriyel biyofilm üzerindeki aktivitelerinin artırılması yönündedir (25) .

Staphylococcus aureus 'un küçük koloni varyantlarına artan direnç nedeni ile, kemik doku enfeksiyonlarında görülen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının tedavisi, zorluğunu sürdürmektedir. *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi için, vankomisin gibi glikopeptid yapıda antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır (26) .

2.3. Biyofilm

Biyofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri hücre dışı polisakkaritler (EPS), proteinler (glukozaminoglikanlar) ile çevreden absorplanan organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabakadır (27) .

Biyofilmler, bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerin ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korurken, besinlerin depolanmasını ve atıkların uzaklaştırılmasını da kolaylaştırır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur (28) .

Biyofilm, madde ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde, antibiyotik etkinliğini güçleştirmektedir. Olgun bir biyofilm içerisindeki organizmalar, biyofilmden çok düşük oranlarda ayrılarak belirli antibiyotiklere karşı daha az duyarlı hale gelirken, yüzeyde yer almak yerine ekzopolisakkarit matriks içerisinde olacak şekilde hareket ederek antibiyotikler tarafından daha zor ulaşılır hale gelirler. Matriksin fizikokimyasal özellikleri ve EPS'den düşük ve geciken penetrasyonun sonucu olarak, biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların öldürülmesi için gerekli olan antibiyotik konsantrasyonu, planktonik haldeki türdeşlerinin tedavisi için gereken antibiyotik konsantrasyonunun 1000 ila 15000 katı arasında olmaktadır (29) .

2.3.1. Biyofilmin Yapısı

Su, %97'ye varan kütleli oranı ile, biyofilm matriksinin ana bileşenidir. Su, bakteriyel hücre kapsüllerini bağlayabileceği gibi, içerisinde çözünen maddeler ile özellikleri tespit edilen bir çözücü olarak da bulunabilir. Biyofilm içerisinde yerleşen hücreler, matriks kütleli oranı sadece %5'ini oluştururken, ekzopolisakkaritler %1-2, globuler glikoproteinler ile litik ürünleri ve üretilen enzimleri de içeren diğer proteinler %1-2, parçalanmış hücrelerden açığa çıkan nükleik asitler %1-2 oranlarında bulunabilmektedir. Ayrıca, lipidler, fosfolipidler ve matriksi saran çevreden gelen serbest iyonlar da matriksin yapısını oluşturan bileşenlerdendir (30) .

Matriks bileşimi, yapışan hücrelerin genotipleri gibi iç faktörler ile matriksi saran fiziko-kimyasal çevreyi içeren dış faktörlerin karışımından temel alır. Bu nedenle, aynı organizma türleri tarafından üretilen biyofilm matriksleri bile, bileşim ve fiziksel özellikleri açısından büyük çeşitlilik gösterebilmektedir (30,31) .

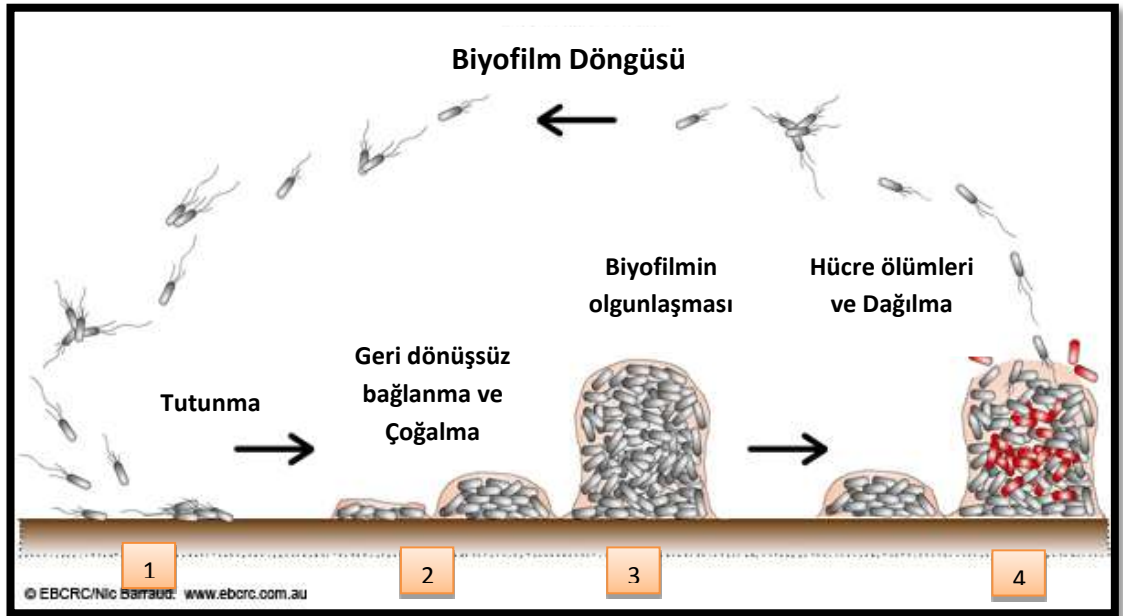
Bakteriler yüzey ile birleştiklerinde, biyofilm oluşturmak için, hücre dışı polimerlerden oluşan müsilajen bir matriks salgırlar. Hücre dışı polimerik salgılar biyofilm içerisindeki mikrobiyal hücrelerin matriksi çevreleyen hücreler ile aktivitesini yapılandıran veya artıran, mikrobiyal mikroçevrenin birincil yapısal bileşenleridir ve biyofilmlerin fiziksel özelliklerini kontrol ederler (32) . Matriks yapısı ve bütünlüğü, matriksi saran makro-çevredeki değişikliklerden yüksek oranda etkilendiği ve biyofilm matriksini sürekli olarak değiştirdiği için, dinamik bir çevre olarak nitelendirilebilir (33)

Matriksin önemli bir özelliği de, yerleşik bakterinin integral hücre yüzeyi bileşenlerinin dış yüzeyinde, biyosentetik mikrobiyal polimerlerin bulunmasıdır. Bu hücre dışı biyopolimerler, ekzopolisakkaritler, nükleik asitler, proteinler, glikoproteinler ve fosfolipitleri içermektedir. Polisakkaritler, yaygın bileşenlerden olmaları nedeni ile, “glikokaliks” terimi, bağlı hücreleri çevreleyen jelatinimsi kütleyi tanımlamak amacı ile kullanılmaktadır (34) .

2.3.2. Biyofilm Oluşum Mekanizmaları

Sentetik veya biyomateryal özellikte olup olmadığı fark etmeksizin, her yüzey, ilk olarak su, elektrolitler ve organik maddeler gibi lokal çevre bileşenleri ile kaplanır. Bu koşullandırılmış film, genellikle herhangi bir mikroorganizmanın yüzey materyaline ulaşmasından önce oluşmakta ve ortamda su, elektrolit ve organik maddelerin varlığı, *in vitro* koşullarda materyal yüzeyi üzerindeki mikrobiyal gelişme ve ileri kolonizasyonu artırıcı etki göstermektedir (35) . Mikroorganizmalar, serbest yüzen planktonik organizma hallerinden, kompleks, yüzeye bağlı topluluğun bir üyesi olan hücreler haline geçerken köklü değişikliklere uğramaktadır. Bu değişiklikler, biyofilm bakterileri tarafından geliştirilen yeni fenotipik özelliklere yansımakta ve çeşitli çevresel sinyallere yanıt olarak oluşmaktadır (36) .

Biyofilm oluşumu farklı aşamalara ayrılarak incelenebilir. Birinci aşamada, materyal yüzeyinde, mikrobiyal adezyon için ilk substratı oluşturacak şekilde koşullandırılmış film birikimi gerçekleşmektedir. İkinci aşamada, organizmalar dönüşümlü olarak substrata bağlanmaktadır. Üçüncü aşamada, yeterli çevresel uyarının (sinyal molekülleri aracılığı ile – Quorum Sensing (QS)) sağlanması durumunda, organizmalar gen ekspresyonlarında, ekstraselüler polimerik maddelerin üretimine ve yüzeye geridönüşsüz bağlanmaya olanak verecek temel değişiklikler geçirmektedir. Dördüncü aşamada, biyofilm büyüyüp, akışkan faza artırılmış kütle transferine olanak veren sütun ve kanallardan oluşan karmaşık üç boyutlu yapıya olgunlaşmaktadır. Son aşamada ise, biyofilm içerisindeki bazı organizmalar planktonik gen ekspresyonu yaptıkları durumlarına geri dönerek, biyofilm döngüsünü yeni konumlarda tekrar başlatma potansiyeline sahip olarak biyofilmi saran çevreye dağılmaktadırlar (29) .



Şekil 2.3. Biyofilm oluşum basamakları: 1) mikroorganizmaların yüzeye tutunması, 2) mikroorganizmaların yüzeye geri dönüşsüz tutunması ve çoğalma 3) biyofilmin olgunlaşması, 4) hücre ölümleri ve dağılma (29) .

Biyofilm içerisindeki bakterilerin hücreler arası iletişimde ve değişen çevre koşullarına karşı davranışlarının düzenlenmesindeki en önemli mekanizmalardan biri de "Quorum Sensing (QS)" olarak adlandırılan sinyal molekülü aracılı işlemidir. QS, pek çok durumda düşük molekül ağırlıklı difüze olabilen sinyal moleküllerinin,

sensör kinazların aktivasyonu veya regülatör proteine yanıtına dayanmaktadır (37) . Yüze tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artar, bu artış ile, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Bu mekanizma aracılığı ile, bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlemektedirler (28,38) .



Şekil 2.4. Biyofilm oluşumunda bakterilerin sinyal molekülü ile iletişimi (28)

Biyofilmlerde dinamik bir denge söz konusudur. Film içerisinde bulunan bakteriler zaman zaman filmde ayrılabilir ve böylece serbest olarak yaşamlarını sürdürebilirler ya da serbest mikroorganizmalar film yapısına katılabilir. Bundan dolayı enfeksiyonlar yayılabilir ve biyofilmlerde karışık enfeksiyonlar oluşabilir.

Bakterilerin biyofilm oluşturmaya neden olan durumlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir (36,39) :

- a) Savunma: Biyofilm kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi bir takım stres güçlerine karşı savunma amaçlı gelişir. Biyofilm içinde yaşayan mikroorganizmalar, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Bu nedenle biyofilm kronik seyirli enfeksiyonlarda bu özelliği kazandıran önemli bir faktör olarak bilinmektedir.
- b) Adhezyon ve kolonizasyon: Bakterilerin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmeleri ve yaşayabilmeleri için yüzey proteinleri ile konakçıya yapışırlar. Yapışma sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli

bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm yapımına başlarlar.

- c) Yaşanabilir çevre geliştirme: Ortamdaki glukozun bakteri tarafından kullanılabilir olması için biyofilme ihtiyaç duyulmaktadır.
- d) Topluluk oluşturmak: Bakterilerin ortama adaptasyonundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir.

2.3.3. Tıbbi Cihazlarda Biyofilm

Son yıllarda, tıbbi uygulamalarda girişimsel tekniklerin ve kalıcı tıbbi cihazların kullanımının artışı biyofilm enfeksiyonlarında da artışa neden olmuştur. Kalıcı tıbbi cihazlar üzerinde gelişen biyofilmler gram-pozitif ve/veya gram-negatif bakteriler ve/veya mayalardan oluşabilir (40-42)

S. aureus ve *S. epidermidis* türü bakteriler, implant kaynaklı enfeksiyonların yaygın nedenlerindedir. *S. aureus*, metal biyomateryal, kemik-eklem ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olurken, *S. epidermidis*, daha çok polimer kaynaklı implant enfeksiyonlarına neden olmaktadır (35) .

Vücuda yerleştirilen tıbbi cihazlar üzerinde biyofilm oluşumunun engellenmesi için günümüzde en yaygın olarak kullanılan yöntem, hastaya sürekli olarak sistemik antibiyotik tedavisi uygulamaktır. Buna ek olarak literatürde, tıbbi cihaz içerisine antibiyotik yerleştirilerek biyofilm oluşumunun önlenmesine yönelik çalışmalar da yer almaktadır. Ancak bu yaklaşımlar, sürekli olarak antibiyotiğe maruz kalma sonucunda hastada sistemik veya lokal direnç meydana gelmesine neden olmaları nedeni ile pratikte fazla uygulanamamaktadırlar (40-42) .

Biyofilm bazlı enfeksiyonlar üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda minimal inhibitör konsantrasyonun binlerce katı konsantrasyonda antibiyotik tedavisi sonrası bile bakteriyel biyofilmin devamlılığını sürdürebildiği gösterilmiştir. Yine bu konuda yapılan *in vivo* çalışmalarda, kullanılan antibiyotiklerin serbest bakterileri öldürerek enfeksiyon semptomlarını baskılayabildiği ancak biyofilme gömülü halde olan bakterileri yok etmekte, biyofilme penetre olmakta yetersiz olduğu ve antibiyotik tedavisi sonlandırıldığında biyofilmin enfeksiyonun tekrarına neden olduğu bildirilmiştir (40-42) .

Biyofilm bazlı enfeksiyonların tedavisinde uygulanan antibiyotik tedavisi ile genellikle tatmin edici sonuçlar alınamadığı için güncel olarak klinikte uygulanan yöntem, üzerinde biyofilm gelişmiş tıbbi cihazın cerrahi işlem ile çıkarılması ve antibiyotik tedavisinin ardından ikinci bir cerrahi işlem ile yeni cihazın yerleştirilmesi şeklindedir. Hasta için oldukça zor olan cerrahi girişimler, aynı zamanda zaman ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Literatürde bu sorunun aşılması ve üzerinde biyofilm oluşan tıbbi cihaz çıkarılmadan tedavinin gerçekleştirilebilmesi için biyofilmdeki matris proteinleri çözen enzim kullanılması veya matris sentezini bloke eden kimyasal reaksiyonlardan yararlanılması ve hücre-hücre haberleşmesini sağlayan sinyal moleküllerinin benzerlerini kullanılması gibi yaklaşımlar bulunmaktadır (24) .

2.3.4. Anti-Biyofilm Yaklaşımları

Anti-biyofilm yaklaşımları;

- a) tıbbi cihaz yüzeyine bakteri yapışmasının engellenmesine yönelik,
- b) biyofilm oluşumunun önlenmesine yönelik,
- c) tıbbi cihaz yüzeyinde oluşmuş biyofilmin ortadan kaldırılmasına yönelik olarak sınıflandırılabilir (24) .

2.3.4.1. Tıbbi Cihaz Yüzeyine Bakteri Yapışmasının Engellenmesi

Mikrobiyal adezyon, yüksek oranda, tıbbi cihazın hazırlandığı materyalin hidrofilitesi ve yüzey yükü gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (24) .

Staphylococcus aureus ve *Staphylococcus epidermidis*, eklem artroplastisinde enfekte bölgeden en sık izole edilen bakteriyel patojenlerdir. Akut enfeksiyonlar sıklıkla, yüksek virülansa ve iltihaplı enflamasyon oluşturma yeteneğine sahip *S. aureus* nedeni ile gelişirken, *S. epidermidis*, düşük virülansı ile subakut enfeksiyon oluşturur. Bu koagülaz-negatif enfeksiyonların tedavisi, glikokaliks ile çevrelenmiş biyofilm salgısı bakteri yapışması nedeniyle oldukça güçtür. Kemik ile protez arasında oluşan biyofilm, konakçı defans mekanizmalarına ve antimikrobiyal terapiye karşı direnç göstermektedir (43) .

Biyofilm oluşumunun engellenmesine yönelik yöntemler, biyomateryal yüzeyini, tıbbi cihaz polimerlerinin antimikrobiyal maddeler ile birleştirilmesi, mekanik tasarımda farklılıklar ve antibiyotik salımı gibi antiadeziv yüzey oluşturacak şekilde fizikokimyasal modifikasyonunu içermektedir; ancak, bu yöntemlerin başarısı, cihazın uygulandığı ortamların ve koloni oluşturacak organizmaların çeşitliliği nedeni ile oldukça düşük olmaktadır (35) .

2.3.4.2. Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi

Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin hücrelerarası iletişim için kullandıkları sinyal molekülleri, özel enzimlerin, virülans faktörlerinin ve metabolitlerin üretilmesi ile ilgili gen ekspresyonunu sağladıkları kadar, biyofilm gibi mikrobiyal toplulukların oluşturulmasını da sağlamaktadır. Bu nedenle, QS mekanizmasını engelleyen moleküllerin kullanımı, konakçı çevreye mikrobiyal adaptasyonu önlemek için umut veren bir yöntemdir (24) .

2.3.4.3. Oluşmuş Bir Biyofilmin Ortadan Kaldırılmasında İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Rolü

Cihaz ile ilgili enfeksiyonlarda, farklı mikroorganizma türlerinin biyofilmlerinin bulunduğu ve bulunan mikroorganizmaların antimikrobiyal direnç geliştirdikleri dikkate alındığında, mikrobiyal ölümün sağlanması için sürekli güncelleştirmeleri gerekli kılmaktadır (24) .

İlaç taşıyıcı sistemler, hedeflenen bölgeye istenen düzeyde, lokal ve kontrollü ilaç taşınmasının sağlanması ve sistemik toksisitenin azaltılması gibi üstünlükleri nedeniyle son zamanlarda anti-biyofilm çalışmalarında üzerinde yoğun bir şekilde araştırma yapılan sistemler haline gelmişlerdir.

Son zamanlarda literatürde biyofilm oluşumunu önlemek veya oluşmuş biyofilmi yok etmek üzere lipozom, implante edilebilir matriks, mikropartikül, fibröz destek matriksi ve termosensitif jel gibi ilaç taşıyıcı sistemler sıklıkla kullanılmaktadır (35,42) .

2.3.5. *Staphylococcus* spp. Kaynaklı Biyofilm

Staphylococcus türleri, glikokaliks veya salgı tabakası içerisine gömülmüş çok tabakalı biyofilm oluşturabilirler. Glikokaliks, enfeksiyon oluşturmak üzere, ölü doku ve kemik veya tıbbi olarak implante edilmiş cihaz üzerinde gelişir. İmplant varlığı, implantasyon sonrası etrafının hızla konakçı proteinler tarafından kaplanması ve bu proteinlerin bakteri yapışması için mükemmel bir kaynak olması nedeni ile enfeksiyon gelişimi için zemin hazırlayıcı bir faktördür (13) .

2.4. Mikroküreler

Mikroküreler, çapları 1000 µm'den küçük, etkin madde yüklü küresel partiküllerdir. Etkin madde, polimerik matriksin kanallarında veya porlarında tutulabildiği gibi, polimerin yüzeyine adsorplanmış veya kimyasal olarak bağlanmış durumda bulunabilir (44,45) .

2.4.1. Mikrokürelerin Özellikleri

Mikrokürelerden beklenen özellikler, uzun etkili ve kontrollü ilaç salımı sağlayabilmesi, etkin maddenin yapı ve aktivitesini değiştirmemesi, *in vitro-in vivo* koşullarda dayanıklı olması, biyolojik sistemlerle uyumlu olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması, farklı fizikokimyasal özellik ve farmakolojik aktivite gösteren etkin madde gruplarını taşıyabilmesi, kolay hazırlanabilmesi, hazırlanmalarından kullanılmalarına kadar geçen sürede fiziksel ve kimyasal olarak dayanıklı olmasıdır (46) .

Mikrokürelerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak tasarlanmasının amaçları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Etkin maddenin uzatılmış ya da kontrollü salımının sağlanması,
- Etkin maddenin hedef organ, doku veya hücreye taşınması,
- Düşük dozda etkin madde kullanımına olanak sağlanması,
- Düşük doza bağlı olarak toksisitenin azaltılması,
- Etkin maddenin stabilitesinin artırılması,

- Yağda çözünen etkin maddelerin formülasyonunda kolaylıklar sağlanması.

2.4.2. Mikrokürelerin Kullanım Alanları

Mikroküreler, farmasötik amaçla, antibiyotikler, antitüberküloz ilaçlar, antineoplastikler, antihipertansifler, steroidler, peptid/proteinler, DNA, aşılarda, antiinflamatuvarlar gibi pek çok etkin madde grubunun kontrollü salımı, pasif hedeflendirilmesi amacı ile kullanılmaktadır (47-49) . İlaç salımının dışında, radyoopak maddeler ile radyolojik görüntüleme, kan akımının tespitinde, implantlarda kullanımı mevcuttur (50) . Mikrokürelerin, göze uygulanması(51) ortopedik olarak hasarlı bölgeye direk uygulanması (52) doku mühendisliği çalışmalarında doku iskeleleri içerisine yerleştirilmesi (53) , mideye ulaşarak mide duvarına biyoadezyon ile tutunarak kontrollü salım yapması (54) gibi pek çok alanda yaygın kullanımı mevcuttur.

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin sistemik uygulanması, kronik enfeksiyon oranını azaltmada yetersiz kalmakta ve bu hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için, antibakteriyel bileşiklerin 4-6 haftaya kadar sürekli yüksek lokal konsantrasyonlarda uygulanması gerekmektedir. Biyoparçalanabilen mikropartiküller, ilaçların uzun süreli uygulanmasında, minimum yan etki ile lokal ve uzatılmış ilaç salımını sağlamaları nedeni ile ilaç taşıyıcı sistem olarak, önemli bir alternatif sunmaktadırlar (52) .

2.4.3. Mikroküre Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Mikroküre hazırlanmasında kullanılan polimerler, biyoparçalanır olan ve biyoparçalanır olmayan olmak üzere iki temel sınıfa ayrılabilir. Bir polimer, sadece, biyokatalitik süreç (bakteri, fungus, enzim gibi) veya kimyasal ve radikal süreç (hidroliz, oksidasyon, UV radyasyon gibi) gibi çevresel etki ile parçalanabiliyorsa biyoparçalanır olarak adlandırılır. İlaç taşınması uygulamalarında biyoparçalanır polimerlerin seçilme nedeni, ilacın tümü salındıktan sonra uygulanan sistemin ameliyat ile çıkarılması gereğini ortadan kaldırmış olmasıdır. Ancak, ilaç taşınmasında kullanılacak polimerlerin sadece biyoparçalanır özellikte olması yeterli

değildir, polimerler aynı zamanda biyouyumlu olmalı ve uygun işlenebilirlik, sterilize edilebilirlik, saklama stabilitesi özelliklerine de sahip olmalıdır. İlaç taşınmasında kullanılan biyoparçalanır polimerler doğal ve sentetik polimerler olarak ikiye ayrılır ve aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (55) :

Tablo 2.2. Mikroküre formülasyonlarında kullanılan biyoparçalanır polimerler

Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Polisakkaridler (dekstran veya seluloz)	Alifatik Poliesterler
Kitin	Poli(glikolid), PGA
Kitosan	Poli(laktid), PLA
Proteinler (kollajen, fibrin, jelatin, albumin)	Poli(glikolid- <i>ko</i> -laktid), PLGA
	Poli(<i>e</i> -kaprolakton), PCL
	Poli(3-hidroksibutirat), PHB
	Poli(3-hidroksibutirat - <i>ko</i> -3-hidroksivalerat), P(HB <i>co</i> -HV)
	Polianhidridler

Tablo 2.3. Mikroküre formülasyonlarında kullanılan biyolojik olarak parçalanmayan polimerler

Hidrofilik Polimerler	Hidrofobik Polimerler
Polietilen oksit	Silikonlar
Polivinil alkol	Poliüretan elastomerleri
Polihidroksimetakrilat	Etilen vinil asetat kopolimerleri
Polivinilprolidon	
Poliakrilamid	

Ortopedik uygulamalarda, doku mühendisliği ve kontrollü ilaç salımı amaçları ile biyoparçalanır polimerler ile hazırlanan mikrokürelerin kullanımı oldukça yaygındır. Ortopedi alanında kullanılan biyoparçalanır polimerler ve kullanım alanlarına ilişkin bazı örnekler Tablo 2.4.'te görülebilir:

Tablo 2.4. Ortopedi alanında kullanılan biyoparçalanır polimerlere ve kullanım alanlarına ilişkin örnekler

Mikroküre Formülasyonunda Kullanılan Polimer	Kullanım Amacı	İçerdiği Etkin Madde	Referans
Poli(D,L-laktik asit) ve Poli(3-hidroksibutirik asit-ko-3-hidroksivaleik asit) (PHBV)	Ortopedik enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi	Füsidik asit	(56) (2009)
Kitosan	Kemik hasarlarında osteojenik aktiviteyi artırmak	Rekombinant insan kemik morfojenetik protein-2(rhBMP-2)	(57) (2010)
Kitosan-Hidroksiapatit Kompoziti	Hasarlı kemik dokusunun onarılması ve bölgenin doldurulması	-	(58) (2012)
Polilaktid-ko-glikolik asit (PLGA)	Postoperatif implant enfeksiyonunun proflaksisi	Gentamisin	(59) (2009)
Polilaktid-ko-glikolik asit (PLGA)	Metisiline dirençli S. aureus kaynaklı diskit enfeksiyonunun tedavisi	Vankomisin	(60) (2011)

2.4.3.1. Polikaprolakton (PCL) Polimeri

Sentetik, toksik olmayan, biyoparçalanır alifatik poliesterler grubunda semi-kristal yapıda bir polimerdir. Kloroform, diklorometan, karbontetraklorür, benzen, toluen, sikloheksanon ve 2-nitropropan içerisinde oda sıcaklığında çözünür; aseton,

2-bütanon, etilasetat, dimetilformamid ve esetonitril içerisinde az çözünür ve alkol, petrol eteri, dietileter ve suda çözünmez. PCL ve kopolimerleri, zincir kesilmesini takiben ağırlık kaybının gerçekleşmesi ile molekül ağırlığının azalması olmak üzere iki faza hidroliz ile parçalanır. Polimerin tamamen hidrolizi ile hidroksikaproik asit oluşur ve *in vivo*'da saptanan tek metaboliti su olmuştur. Küçük ilaç moleküllerine yüksek permeabilite göstermesi, polilaktid ve glikolidlere oranla parçalanma ürünlerinin asidik çevre oluşturmaması, diğer polimerler ile karışımlarının hazırlanabilir olması ve bir yıldan daha uzun süreli ilaç salımının sağlanması açısından homopolimerlerinin PLGA ve poliglikolik asit-ko-laktik asit polimerlerine göre çok daha yavaş parçalanması PCL'nin en önemli üstünlükleridir. İlaç salımı, erozyon kontrollü salıma oranla daha çok difüzyon kontrollü olarak olmaktadır (49,55,61,62) .

2.4.4. Mikrokürelerin Hazırlama Yöntemleri

Çeşitli mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin seçimi, mikrokürelerin partikül boyutu, uygulama yolu, ilaç salımının süresine bağlıdır ve bu karakterler karıştırma hızına, çapraz bağlama tekniğine, uçurma süresine, ko-presipitasyon ve bunun gibi teknik özelliklere bağlı olarak değişmektedir. Mikroküre hazırlama yöntemi, ilacın stabilitesini ve aktivitesini olumsuz yönde etkilememeli, yöntemin hazırlama verimi ve enkapsülasyon etkinliği yüksek olmalı, üretilen mikrokürelerde agregasyon olmamalı, aynı özellikte mikroküreler tekrar üretilebilir olmalıdır. Mikroküre hazırlanmasında kullanılan yöntemler (49,63-66) :

- Monomer polimerizasyonu
- Emülsiyon oluşturma - Çözücü buharlaştırma
- Emülsiyon oluşturma – Çapraz bağlama
- Emülsiyon oluşturma - Çözücü difüzyonu
- Koaservasyon
- Püskürterek kurutma
- İyonik jelasyon

- Hot melt (Eriterek) mikroenkapsülasyon
- Süperkritik sıvı teknolojisi

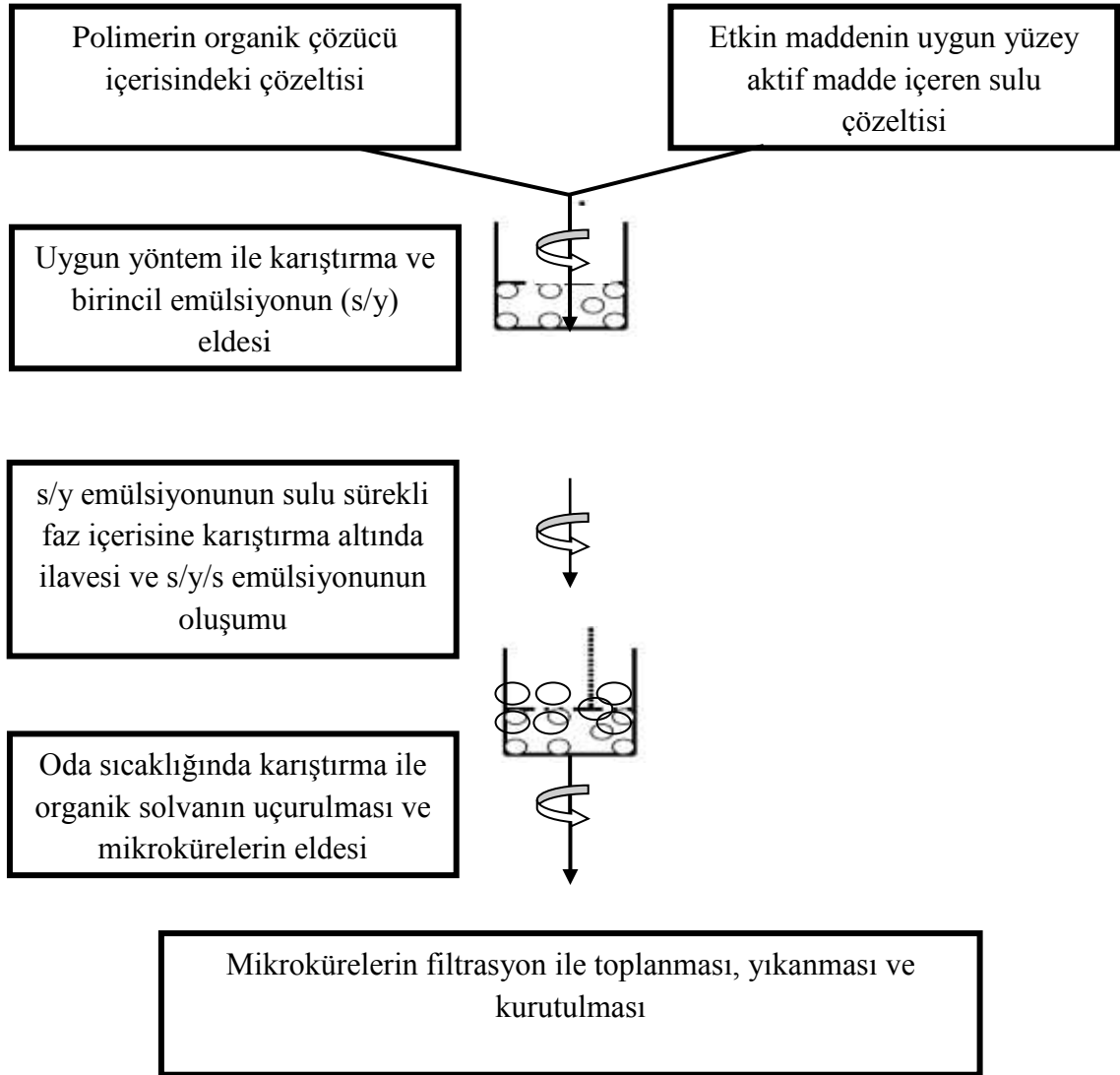
Sıralanan bu yöntemlerden çalışmalarımızda mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan yöntem açıklanacaktır.

2.4.4.1. Emülsiyon Oluşturma – Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Bu yöntemde, polimer, uygun bir su ile karışmayan çözücü içerisinde çözülür ve etkin madde bu polimerik çözelti içerisinde disperse edilir veya çözülür. Sonuç çözelti veya dispersiyon, ayrı damlacıklar oluşturacak şekilde sulu bir sürekli faz içerisinde emülsifiye edilir. Mikrokürelerin oluşması için, öncelikle organik çözücünün sulu faza difüze olması, ardından su-hava arayüzünden buharlaşması gerekmektedir. Çözücünün buharlaşması ile mikroküreler sertleşir ve serbest akan mikroküreler uygun bir filtrasyon ve kurutma ile hazırlanır (67,68) . Bu yöntemle, Y/S (yağ/su) ve S/Y (su/yağ) gibi tekli emülsiyonların yanı sıra, S/Y/S (su/yağ/su) gibi çoklu emülsiyonlar oluşturularak da mikroküreler hazırlanabilmektedir.

2.4.4.1.1. Çoklu Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Suda çözünen etkin maddelerin mikrokürelerinin hazırlanmasında enkapsülasyonu artırmak amacı ile tercih edilir. Etkin maddenin sulu çözeltisinin, organik solvan içerisindeki polimer çözeltisinde uygun bir karıştırıcı kullanılarak emülsifiye edilmesi ile S/Y emülsiyonu elde edilir. Bu emülsiyonun, uygun bir karıştırıcı kullanılarak sulu sürekli faz içerisinde damlacıklar oluşturacak şekilde emülsifiye edilmesi ile S/Y/S sonuç emülsiyonu elde edilir. Çözücünün uzaklaştırılması ve mikrokürelerin uygun bir yöntem ile filtre edilmesi ile mikroküreler elde edilir. Emülsiyon hazırlanması sırasında, fazlar arası yüzey gerilimini düşürmek amacı ile sulu fazlara çeşitli yüzey aktif maddelerin (polivinil alkol-PVA gibi) ilavesi yapılabilmektedir (55,69,70) .



Şekil 2.5. Çoklu emülsiyon oluşturma – çözücü buharlaştırma yönteminin şematik gösterimi

2.4.5. Mikrokürelerin Karakterizasyonları

Mikrokürelerin karakterizasyonları, partikül boyutu ölçümü, yüzey morfolojisinin incelenmesi (Taramalı Elektron Mikroskopu – SEM), ilaç yükleme etkinliğinin tespiti, ilaç-polimer etkileşmesinin tespiti, ilaç salımı tayini ile gerçekleştirilmektedir (65) .

2.4.6. Mikrokürelerin Sterilizasyonları

Sterilizasyonda temel amaç, tıbbi malzemedeki mikroorganizmaların tamamının yok edilmesi ve uzaklaştırılmasıdır. Teoride, sterilizasyona maruz kalan mikroorganizmaların hayatta kalma olasılığının zamanla katlanarak azalması gerekmektedir. Genel olarak Avrupa’da, bir malzemenin “steril” olarak etiketlenmesi için, hayatta kalma seviyesi veya sterilite güvence seviyesi (SAL) 10^{-6} kabul edilmektedir. Tıbbi malzemelerin geleneksel olarak sterilizasyon yöntemleri, kuru hava veya nemli sıcak hava kullanılarak termal sterilizasyon ile, kimyasal (etilen oksit) yol ile veya radyasyon ile olmaktadır. Sıcaklık ile sterilizasyonda sıklıkla polimer omurgasında degradasyon olurken, kimyasal sterilizasyonda da sterilizasyon ajanının kalıntılarının kalmasına dayalı toksikolojik problemler oluşmaktadır. Radyasyon ile sterilizasyon uygulama kolaylığından dolayı polimerik malzemelerin sterilizasyonunda tercih edilmektedir. Gama radyasyonu ile sterilizasyonda, 25 kGy (2.5 Mrad) doz, farmasötik ürünlerin sterilizasyonunda genel olarak yeterli kabul edilmekte ve pek çok yayında polimerik malzemenin yapısal özelliklerinde önemli değişimlere neden olmadığı gösterilmektedir (55,71) .

2.5. Jeller

Jeller, uygun jelleştirme ajanlarının uygun sıvılar ile jelleştirilmesiyle meydana gelen yarı katı preparatlardır (72) . Jeller, maddenin ara hali olup, hem katı hem de sıvı bileşenleri içeren yumuşak, katı ya da katıya benzeyen yapılardır. Bir sıvı tarafından birbirine nüfuz etmiş küçük inorganik partiküllerin ya da büyük organik moleküllerin süspansiyonlarından oluşan yarı katı sistemlerdir. Küçük katı madde veya çözünmeyen parçacıkların sıvı ortamda dağılması ile oluşmuşlardır. Katı bileşen olan jel yapıcı madde, sıvı sürekli fazın hareketini engelleyerek birbiri ile bağlantılı moleküller ile kümeleşmiş yapıların üç boyutlu ağ yapısını oluşturur (73-75) .

2.5.1. Jellerin Sınıflandırılması

Avrupa Farmakopisi 7.6’ya göre iki grupta sınıflandırılırlar.

2.5.1.1.Lipofilik Jeller

Lipofilik jeller (oleojeller), genellikle polietilenglikollü sıvı parafin, koloidal silika, alüminyum çinko sabunlarıyla jelleştirilmiş yağlardan oluşan preparatlardır (72) .

2.5.1.2. Hidrofilik Jeller

Hidrofilik jeller (hidrojeller), genellikle poloksamerler, nişasta, selüloz deriveleri, karbomerler ve magnezyum-alüminyum silikatlar gibi uygun jelleştirme ajanlarının su, gliserin veya propilen glikol ile jelleştirilmesi ile oluşan preparatlardır (72) .

2.5.2. Jellerin Mikro Yapısı

Jelleştirici ajanlar, uygun bir sıvı içerisinde disperse edildiklerinde, sıvı ile karışarak üç boyutlu, koloidal ağ yapısı oluştururlar. Bu ağ, çözücü moleküllerini hapsederek veya hareketsizleştirerek, moleküllerin akışını sınırlar ve jelin akmaya karşı direncinden ve bu nedenle viskoelastik özelliklerinden sorumludur (76) . Ufak anorganik partiküller, jel yapısı içinde üç boyutlu ağ oluştururken, doğal veya sentetik polimerler olan büyük anorganik makromoleküller ise birbirlerinin zincirleri ile temasta olarak jel yapısını oluştururlar (77) . Jel ağı, temel olarak polimerik etkileşimlerden oluşmasına rağmen, jelin bütünlüğünü belirleyen esas, polimer-solvan afinitesinin doğasıdır. Klasik jel teorisi; jel ağı içinde çözücünün serbest olduğu sistemler, çözücünün tabaka olarak ağ yapıya bağlı olduğu sistemler ve çözücünün jel ağı içerisinde hapsedildiği sistemler olmak üzere üç farklı polimer-çözücü afinitesi gösterir. Verilen bir jeldeki üç solvan tipinin oranı, polimer konsantrasyonu ve polimerin solvan afinitesine bağlıdır (76) .

Jel ağları farklı yapılar şeklinde oluşur. Bunların en bilinen birkaç tanesi (12) :

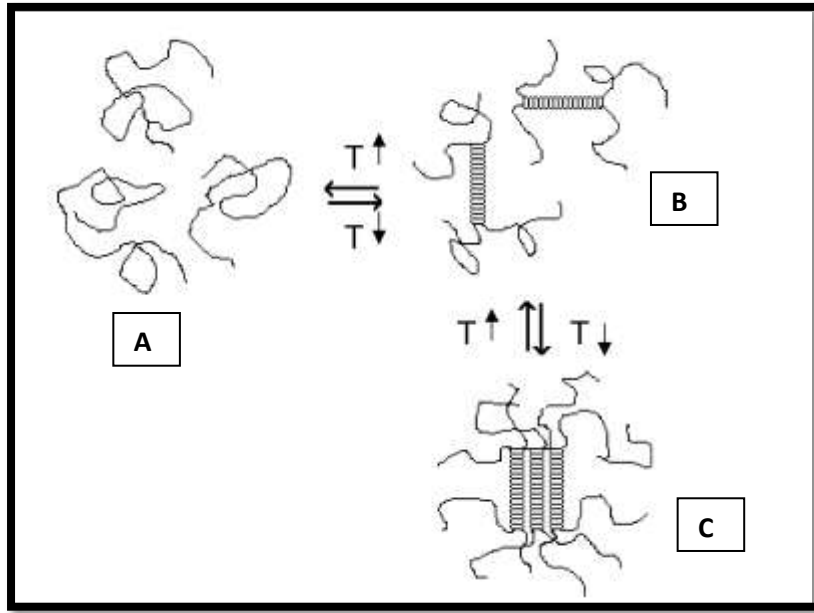
- “Random coil”; gelişigüzel halka şeklinde kıvrılmış ipliklerden oluşan bir yapıdır, en çok sentetik polimerler ve selüloz türevlerinde görülür.
- “Helix”; iki adet polimer zincirinin birbirine sarılması ile oluşmuş helozon şeklinde bir yapıdır, ksantan ve nişastada görülür.

- “Stacks”; raf tipi olarak tanımlanabilir, yumurta kolilerinin üst üste dizilmesi şeklinde bir görüntü oluşturur, kalsiyum aljinatta görülür.
- “The house of cards”; kartlar ile yapılmış eve benzer biçimde bir görüntü oluşturur, bentonit ve veegumda görülür.

2.5.3. Termosensitif Hidrojeller

Büyük miktarlarda suyu absorbe edebilen hidrofilik üç boyutlu polimerik ağ yapılarından oluşan hidrojeller, biyomedikal alanda gittikçe artan bir öneme sahiptir. İlaç salım sistemleri ve doku mühendisliği alanlarını da kapsayan biyomedikal uygulamalarda hidrojel araştırmalarında yeni yaklaşım, *in situ* oluşan sistemler üzerinde yoğunlaşmaktadır. *In situ* oluşan sistemler, uygulama öncesi sıvı sulu çözelti halinde olup, fizyolojik koşullarda gel haline dönüşen sistemlerdir(78,79) . Bu alanda ilk araştırmalar sulu çözeltilerinde sol-jel geçişi gösteren poli(etilen glikol)/poli(propilen glikol) blok kopolimerleri (poloksamerler), poli(etilen glikol)/poli(butilen glikol) blok kopolimerleri, poloksamer-g-poli(akrilik asit) ve nizopropilakrilamid termosensitif jel malzemelerinin sentezinde odaklanmıştır. Agaroz, jelatin, amilopektin, selüloz türevleri, karrajenler gibi bazı doğal polimerler de termodönüşümlü jelleşme özellikleri göstermektedirler (78) .

Jelatinde üçlü helikal konformasyonun ve polisakkaritlerde çift helikal konformasyonun renatürasyonu, jel oluşumu sırasında çekirdeklenme ve kristal büyümesi oluşumuna neden olur. Helezonların agregasyonu sonucu heliks oluşumu, birleşme noktası oluşumu ile sonuçlanır (Şekil3). Yüksek sıcaklıklarda, gelişigüzel sarmal (random coil) konformasyonu oluşturma eğilimindedirler. Sıcaklığın düşürülmesi ile düğüm noktaları; başka bir deyişle jelin fiziksel kavşakları gibi davranan çift helezonlar ve agregatlar oluşturmaya başlarlar (80) .



Şekil 2.6. Polisakkaritlerin su içerisinde jelleşme mekanizması. A: Gelişigüzel sarmallar (random coil), B: Heliks şekline dönüşmesi, C: Heliks yapısının son aşamada jelin kavşak bölgelerini oluşturacak şekildeki agregasyonu (80)

In situ jel oluşumunun sağlanması için; çözücü değişimi, UV-ışınlama, iyonik çapraz bağlama, pH değişimi ve sıcaklık değişimi gibi pek çok mekanizma mevcuttur. Bu yaklaşımlardan, organik çözücü, kopolimerizasyon ajanı veya dışarıdan uygulanan jelleşmeyi tetikleyici bir madde gerektirmeyen ve çevre sıcaklığının değişmesi ile sıcaklık duyarlı hidrojel oluşumunu sağlayan termosensitif yaklaşım biyomedikal uygulamalarda büyük ilgi görmektedir. (78,79)

2.5.3.1. Kitosan Termosensitif Hidrojeller ve Hazırlama Şekilleri

Kitosan, kitinin farklı deasetilasyon ve depolimerizasyon derecelerinde deasetilasyona uğratılması ile oluşmakta ve bu nedenle kesin kimyasal kompozisyonu kolayca tespit edilememektedir. Suda çözünür özellikle olabilmesi için deasetilasyon derecesinin %80-85'ten daha fazla olması gerekmektedir (62) . Kitosan, biyomedikal uygulamalarda bolluğu ve geniş uygulama alanı nedenleri ile önemli rol oynayan, biyoparçalanır, biyoyumlu ve mukoadesif bir biyopolimerdir. Kitosanın, yine biyoparçalanır bir madde olan gliserofosfat (GP) ile kombinasyonu, ilaç taşınması alanında umut vadeden termosensitif hidrojel oluşturmaktadır.

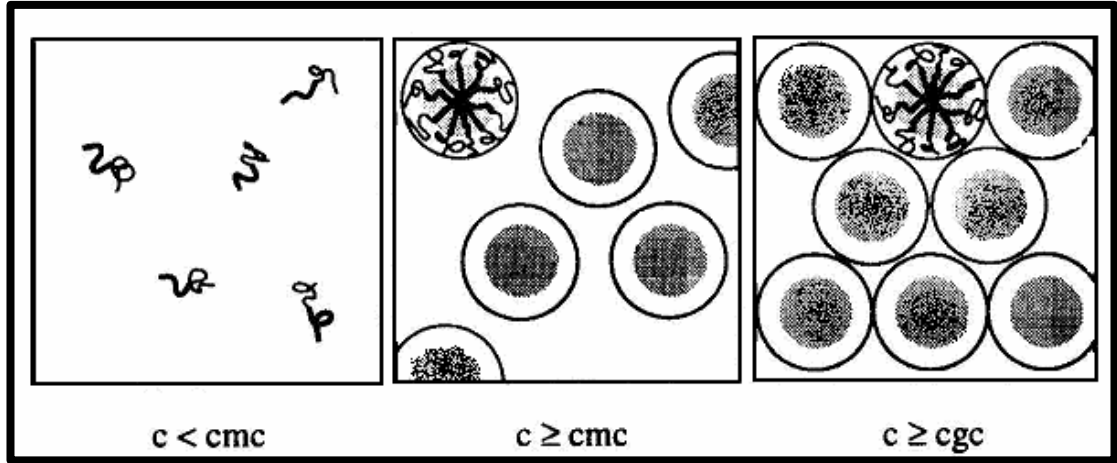
Herhangi bir yüzey aktif madde, çapraz bağlayıcı ajan veya organik çözücü içermemesi, bu sistemi pek çok hassas biyolojik ürün ile geçimli hale getirmektedir. Gliserofosfatın kitosan çözeltisine ilavesi, pH'yı artırarak, kitosan zincirleri arasındaki elektrostatik itmeyi azaltmaktadır. Bu tepki, kitosanda zincirler içi hidrojen bağlarının kurulmasını artırmaktadır. Buna ek olarak sıcaklıktaki artış, su molekülleri ile kitosan zincirleri arasındaki hidrojen bağlarını serbest bırakmakta, bu da kitosan zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerin artışına neden olmaktadır (81,82) .

Termosensitif kitosan hidrojellerin hazırlanması için, kitosan, uygun bir asit ile hazırlanmış uygun molaritede asidik çözelti içerisinde (asetik asit çözeltisi, hidroklorik asit çözeltisi gibi) çözülür ve +4 °C'ye soğutulur. Diğer taraftan, gerekli miktar gliserofosfatın sulu çözeltisi hazırlanır ve +4 °C'ye soğutulur. Termosensitif kitosan jel, gliserofosfat çözeltisinin +4 °C'de sürekli karıştırma altındaki kitosan çözeltisine damla damla ilavesi ile oluşur (81-83) .

2.5.3.2. Poloksamer Termosensitif Hidrojeller ve Hazırlanma Şekilleri

Poloksamerler, noniyonik polioksietilen-polioksipropilen kopolimerleridir. Çeşitli oral, parenteral ve topikal farmasötik formülasyonlarda kullanılmakta olan poloksamerler, genel olarak toksik ve iritan olmayan malzemeler olarak kabul edilmektedirler. Vücutta metabolize edilmezler (62) . Poloksamerlerin jelleşme sıcaklıkları, çapraz bağlayıcı ajanlarla ve monomerlerle ayarlanabilmektedir (84) . Poloksamerlerin jelleşme mekanizmaları 1980'lerin başlarından beri araştırılmaktadır, miseller özelliklerindeki agregasyon numarası veya miseller simetri gibi bir yapısal değişikliğin sulu poloksamer çözeltisinin jel oluşturmasına neden olduğu düşünülmektedir. Bu durum, artan sıcaklık ile kritik misel konsantrasyonundaki azalmanın sağlanmasından temel almaktadır (Şekil 2.7.) (80) .

Pluronic F 127, su içerisinde termodönüşümlü jelleşme özelliği gösterir. Protein stabilitesini artıran ve kontrollü ilaç salımı sağlayan yüksek viskozitede sıvı kristal mezofaz oluşturabilmektedir (85) .



Şekil 2.7. Blok kopolimer çözeltisindeki kritik misel konsantrasyonunun (cmc) ve kritik jel konsantrasyonunun (cgc) şematik gösterimi (73)

Poloksamer termosensitif hidrojeller soğuk yöntem ile hazırlanırlar. Bu amaçla, uygun miktarda tartılan poloksamer, +4 °C'ye soğutulmuş sürekli karıştırma altındaki saf su içerisine yavaş yavaş ilave edilir ve sistem bir gece +4 °C'de karışmaya bırakılır (84) .

2.6. Serratiopeptidaz

2.6.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Lisanslı ürün bilgilendirmesine göre, beyaz veya bronz renkte, serbest akan, suda çözünen, kendine has koku ve tadı bir tozdur. Aktivitesi için en uygun pH 8,5-9,5 arasında, en uygun sıcaklık 40 °C'dir. pH 5,5 ile 9,5 arasında ve 40 °C'de stabildir, ancak 60 °C'de 10 dakika içerisinde hızla aktivitesini kaybetmektedir (86) .

2.6.2. Farmakolojik Özellikleri

Serratiopeptidaz (serrapeptaz) (SP), patojenik olmayan *Serratia spp.*'den izole edilen proteolitik enzimdir. Enflamasyonun ve travma, enfeksiyon, solunum yolu tıkanıklıkları veya kronik venöz yetmezlik durumlarında oluşan ödemin azaltılmasında 5-10 mg (10 000-20 000 ünite) dozda günde üç defa oral yol ile kullanılmaktadır (87) .

Serratiopeptidaz, kandaki alfa-2-makroglobülini 1:1 oranında bağlayarak antijenisitesini maskelerken enzimatik aktivitesini sürdürerek yavaşça inflamasyon bölgesine aktarılır. Serratiopeptidaz, ödem oluşumundan sorumlu bradikinin, histamin ve serotoninini hidrolize eder.(12,88)

Enzimin, fibrin, biyofilm ve inflamatuvar araçlar gibi çözünmeyen protein ürünlerinin degradasyonunu artırdığı bilinmektedir. Aynı zamanda, sızıntının viskozitesini azaltmakta, drenajı hızlandırmakta ve bradikinin salımını inhibe ederek ağrıyı hafifletmektedir. (43) Ayrıca, yapılan son araştırmalarda bazı bakteri türlerinde adhesin ekspresyonunu modüle etmek suretiyle oluşmuş biyofilmin parçalanmasında etkili olduğu ve antibiyotiklerin biyofilme penetrasyonunu artırdığı bildirilmiştir (89) . Bunun, bakteriyi çevreleyen fibrinoz pıhtının hidrolizi ile enfeksiyon bölgesindeki antibiyotik konsantrasyonun artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Denenen farklı proteolitik enzimler arasında, *in vitro* koşullarda antibiyotik aktivitesinde ve biyofilm üretiminin inhibisyonunda en yüksek artışı sağlayan enzimin serratiopeptidaz olduğu tespit edilmiştir (43) .

2.6.3. Serratiopeptidaz Enzim Aktivitesi Tayin Yöntemleri

Serratiopeptidazın proteolitik aktivitesi, kazeinin 37 °C de, pH 7.0 de 30 dk proteolitik hidrolizini temel alan yöntem ile gerçekleştirilir. Bunun için, hidrolize olmamış kazein filtre edilerek ortamdan uzaklaştırılır ve çözünmüş kazein miktarı spektrofotometrik olarak 275 nm de tayin edilir. Bu yöntemde “Bacillus subtilis var.” ve “Bacillus licheniformis var.” den elde edilmiş preparatların proteaz aktivitesi proteaz ünitesi (PC) ünitesi olarak ifade edilmektedir. Bir bakteriyal PC, miktar tayini şartlarında dakikada 1.5 µg/mL L-tirozine eşdeğer miktarda enzim miktarı olarak ifade edilmektedir. Enzimin aktivitesi aşağıda belirtilen Eşitlik-1 ile hesaplanmaktadır (90) :

$$\frac{\text{PC}}{\text{g}} = \frac{\left(\frac{\text{Au}}{\text{As}} \right) \left(\frac{1.56}{30 \text{ w}} \right)}{\text{Eşitlik- 1}}$$

Au = test okumasından boş okumanın çıkarılması sonucu elde edilen değer

As = standart çözeltinin absorpsiyonu

1.56 = reaksiyon karışımının mL olarak son hacmi

30 = reaksiyon süresi, dk.

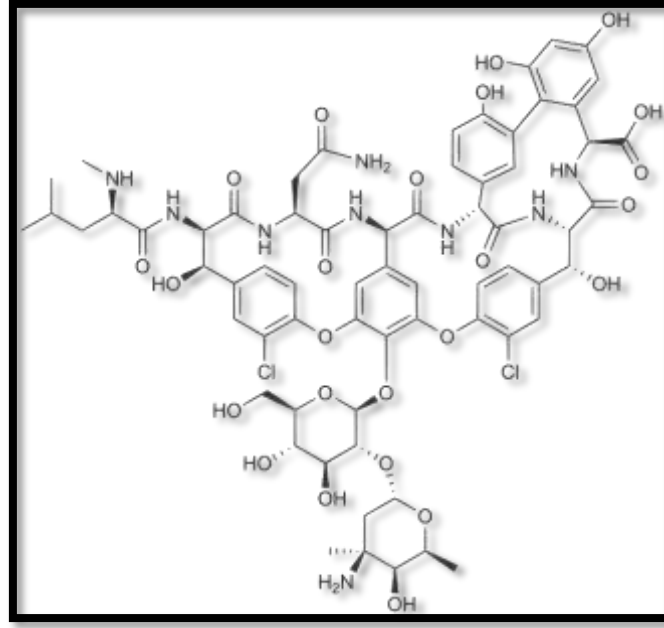
w = original numunenin “g” deki ağırlığı

g = g değeri

2.7. Vankomisin

2.7.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Vankomisin, temel olarak *Amycolatopsis orientalis*'in suşları tarafından üretilen vankomisin B içeren glikopeptidlerin karışımıdır. Vankomisinin hidroklorür tuzu, beyaz veya beyaza yakın renkte, kokusuz, higroskopik tozdur. 1 kısmı 10 kısım suda, 700 kısım alkolde çözünür. Sudaki %5'lik çözeltisinin pH'sı 2.5 ile 4.5 arasındadır. İzoelektrik noktası yaklaşık pH 5'tir. Molekül ağırlığı 1485,7'dir. Lisanslı ürün bilgilendirmesine göre 2-8°C arasında saklanması bildirilmiş olmasına rağmen, farklı seyrelticiler içerisindeki çözeltileri (%0.9'luk sodyum klorür, %5 glukoz, ve peritoneal diyaliz çözeltisi içerisinde) oda sıcaklığında en az 14 gün dayanıklı kaldığı gösterilmiştir (72,87,91) .



Şekil 2.8. Vankomisinin moleküler formülü (92) (alıntılanma tarihi: 04.11.2012)

2.7.2. Vankomisinin Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri

Glikopeptid yapıda bir etkin madde olan vankomisin, *Staphylococcus aureus* ve diğer *Staphylococcus* türleri gibi Gram-pozitif bakteri türlerine karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösteren ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların profilaksisinde ve tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezini inhibe ederek aktivitesini gösterir (93) . Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının tedavisinde birinci sırada tercih edilen antibiyotiktir. (94)

Vankomisin, oral yol ile uygulandığında tam olarak absorbe edilemez ve birincil olarak renal yol ile elimine edilir, tek doz uygulama sonrası >%80–%90’lık bir oranı uygulama sonrası 24 saat içerisinde ürinden değişmeden elde edilir (95) . Normal kreatinin klerensine sahip hastalarda, eliminasyon yarı ömrü 6-12 saat arasında ve dağılım hacmi 0,4-1 L/kg’dır. Vankomisin proteinlere bağlanmasının, %10 ile %50 arasında olduğu literatürde bildirilmiştir (96-98) . Dokulara dağılımı, uygulama miktarı ve proteinlere bağlanma etkisi, vankomisin total aktivitesine etki eden faktörlerdir(99) .

Toksisite açısından incelendiğinde, nefrotoksik olmadığına ilişkin hayvan deneyleri bulunmasına rağmen, serum vankomisin konsantrasyonlarının renal hasara yol açtığını gösteren bazı klinik çalışmalar vardır. Klinik raporların aksine, hayvan deneyi çalışmalarında, serum konsantrasyonu ile ototoksiste arasında bir ilişki bulunamamıştır ve uzmanların büyük çoğunluğu ilacın ototoksik olmadığı görüşündedir (99) .

2.7.3. Vankomisin Miktar Tayini Yöntemleri

Vankomisinin miktar tayini için, mikrobiyolojik yöntemler (100) , kütle spektroskopisi (101) , biyoassay, radyoimmünoassay (RIA), floresans polarizasyon immünoassay (FPIA) (102) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (103-105) , yöntemleri kullanılabilir. Bütün bu yöntemler arasında, HPLC analizi, en kolay ve kısa zamanda sonuç veren yöntem olmasa da, çok düşük miktarlardaki vankomisini yüksek hassasiyet ve doğruluk ile en hassas ve özgün saptayan yöntemdir. HPLC analizi, FPIA gibi yöntemlerle saptama sınırının altında kalan doku ve kemikteki vankomisin miktarlarının saptanmasında kullanılmıştır (103) . Güçlü katyon değişimi-katı faz ekstraksiyonu yöntemi ile (106) , floresan dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile (104) , floresans polarizan immunoassay yöntemi (107) gibi yöntemler kullanılarak biyolojik numunelerden VA tayini yapılması mümkündür.

2.7.3.1. Vankomisin Miktarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Tayini

Tez çalışmalarımızda kullanılan bir yöntem olması nedeni ile bu kısımda daha ayrıntılı açıklama yapılmaktadır. Vankomisinin ve parçalanma ürünlerinin miktarının HPLC analizi ile saptanması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (104,105,108,109) . USP 30-NF 25'te vankomisin HCl'nin HPLC analizi için belirtilmiş olan koşullarda, pH 3.2'ye ayarlanmış trietilamin tamponu içerisinde farklı oranlarda asetonitril ve tatrahidrofuran içeren iki farklı mobil faz izokratik ve lineer gradient koşullarda 280

nm dedektör ve 4.6 mm x 25 cm boyutlarında, 5 µm boyutlu küresel partikül içeren C 18 kolon (USP L1 Kategorisinde) ile 30 dakika boyunca analiz edilir (91) .

2.7.4. Vankomisin Piyasa Preparatları

Vankomisin, Türk ilaç piyasasında parenteral uygulama için müstahzarları bulunmaktadır. Ticari isimleri Edicin ®, Vancocin CP®, Vancorin®, Vancotek®, Vankomisin HCl® olan bu preparatlar, İ.V. uygulama için liyofilize toz ve çözücü ampulünü içermekte ve enterokoklar da dahil streptokoklar, *Corynebacterium* ve *Clostridium* ile *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis* gibi gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde endikedir. Özellikle metisiline dirençli stafilokok enfeksiyonlarında tercih edilmektedir. Farmakopelerde kayıtlı preparatları steril vankomisin hidroklorür, vankomisin hidroklorür kapsül, enjeksiyonluk vankomisin hidroklorür, vankomisin hidroklorür oral çözeltisi olarak verilmiştir (91,110) .

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Diklorometan	Sigma Aldrich, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Riedel De Haen, Almanya
Pluronic® F127	Sigma Aldrich, Almanya
PCL (Mw 14.000 Mn 10.000)	Sigma Aldrich, Almanya
PCL (Mn 60.000)	Sigma Aldrich, Almanya
PCL Mn 70.000-90.000	Sigma Aldrich, Almanya
Vankomisin hidroklorür	Sandoz Pharm. Co. , Türkiye
Serratiopeptidaz	Speciality Enzymes and Biochemicaals Co., Amerika
PVA	Sigma Aldrich, Almanya
Kitosan (düşük molekül ağırlıklı)	Fluka BioChemika, İsrail
β - Gliserofosfat	Sigma Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich, Almanya
TSA besiyeri	Merck, Almanya
Müller Hinton agar	BD Besiyeri

3.1.2. Kullanılan Biyolojik Maddeler

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35984
-----------------------------------	------------

3.1.3. Kullanılan Aletler

DSC	PerkinElmer Diamond DSC, Almanya
SEM	Nova Nanosem 430, Amerika
UV Spektrofotometresi	UV-1800 Shimadzu Ultraviyole Spektrofotometresi (Kyoto, Japonya)
FT-IR Spektrofotometresi	FT-IR/FT-Raman (Bruker IFS 66V/S)
Liyofilizastör	Heto PowerDry PL 3000, Danimarka
Membran filtre	Millipore, ABD
Hassas terazi	Shimadzu AX 200, Japonya
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Mekanik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Mekanik karıştırıcı	Silverson L4RT, İngiltere
HPLC kolonu	µBondapak, Waters, UK, C18, 10µm 125A, 3.9 x300 mm
HPLC	Agilent Technologies, 1200 Series, Almanya
Optik mikroskop	Leica DFC 320, Almanya
Partikül büyüklüğü tayin cihazı	Malvern Mastersizer (Hydro 2000S)
Yatay çalkalayıcılı su banyosu	Memmert, Almanya
Ultra saf su cihazı	Merck Millipore / Milli-Q Advantage
Vorteks	Fine vortex, FINEPCR, Kore
pH metre	Sartorius PP-20, Almanya
Çalkalamalı İnkübatör	GRANT ES-20, İngiltere

3.2. Yöntem

3.2.1. Vankomisinin Kimyasal, Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Tayini

3.2.1.1.Vankomisin HCl'nin UV Spektrumu

Vankomisin HCl'nin, pH 7,4 fosfat tamponu (PBS) içerisinde, $\lambda=200-400$ nm aralığında, UV-1800 Shimadzu Ultraviyole Spektrofotometresi (Kyoto, Japonya) kullanılarak UV Spektrumu çekilmiş ve maksimum dalga boyu (λ_{max}) belirlenmiştir.

3.2.1.2.Vankomisin HCl'nin Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu

Vankomisin HCl'nin, FT-IR spektrumu, ATR (attenuated total reflectance) kullanılmak sureti ile, FT-IR/FT-Raman (Bruker IFS 66V/S) spektrofotometresinde tayin edilmiştir. Vankomisin HCl 1/100 oranında potasyum bromür ile karıştırılmış ve elde edilen homojen karışımın sıkıştırılması ile hazırlanan disklerin IR Spektrumu $4000-400$ cm^{-1} aralığında alınmış olup dalga sayısı cm^{-1} cinsinden değerlendirilmiştir.

3.2.1.3.Vankomisin HCl'nin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramı

Diferansiyel taramalı kalorimetri yöntemi (DSC), kimyasal maddelerin termodinamikleri, stabiliteleri ve moleküler yapılarının tayinleri ve incelenmesi gibi amaçlar ile kullanılmaktadır. Antibiyotik özellikli etkin madde vankomisin HCl'nin termal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile DSC termogramı çekilmiştir. Analiz için standart alüminyum örnek kaplarını tam olarak dolduracak kadar numune, örnek kabının yüzeyini tam olarak kaplayacak ve boşluk bırakmayacak şekilde doldurulmuştur. DSC çalışmalarında kullanılan analiz koşulları aşağıdaki gibidir:

- Cihaz: PerkinElmer Diamond DSC

- Atmosfer: Azot (50 mL/dk)
- Başlangıç ve bitiş sıcaklıkları: 25-300 °C
- Sıcaklık yükseltme ve soğutma hızı: 10 °C/dk
- Standart: Alüminyum pan

3.2.1.4.Vankomisin HCl'nin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Saptanması

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK, µg/mL) değerinin saptanması çalışmalarında CLSI'in (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerdiği mikrodilüsyon yöntemi esas alınmıştır. Çalışmalarda *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (American Type Culture Collection) bakteri suşu ve Müller Hinton sıvı besiyeri (MHSB) kullanılmıştır (111) .

Deneyisel çalışmalara başlamadan bir gece önce Müller Hinton agara (MHA) ekilen *S. epidermidis* ATCC 35984 bakteri suşu, çalışma günü MHSB'a alınarak 37 °C'de 2-6 saat inkübe edilmiştir. Bakteri süspansiyonunun bulanıklığı MHB kullanılarak McFarland 0,5 süspansiyonuna eşdeğer bulanıklığa getirilmiş ($0,5 \times 10^8$ cfu/mL) ve sonuç inokulum 5×10^5 cfu/mL (5×10^4 cfu/kuyu başına) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deneylerde, her sırasında 12 kuyu bulunan 8 sıradan oluşmuş steril U tabanlı mikrotitrasyon plakları kullanılmıştır. Tüm kuyulara steril damlalık kullanılarak 0,05 mL sıvı besiyeri dağıtılmış, sonra 1. kuyuya steril mikropipet yardımıyla konsantrasyonu bilinen VA çözeltisinden 0,05 mL koyulmuştur. Her sıranın 1. kuyusundaki karışım 8 kanallı mikropipetle iyice karıştırılarak 2. kuyuya aktarılmış, aynı işlemler 2'den 3'e, 3'ten 4'e ... 10'dan 11. kuyuya kadar sürdürülerek 11. kuyudan 0,05 mL çözelti dışarı atılmıştır. Böylece kuyularda 2 kat artan oranlarda seri dilüsyonlar yapılmıştır. Bundan sonra kuyuların tümüne steril damlalık ile bakteri süspansiyonundan 0,05 mL eklenmiştir. Mikrotitrasyon plaklarının son sıradaki çukurlarından biri üreme kontrolü (besiyeri ve mikroorganizma) diğeri ise besiyeri (sadece besiyeri) kontrolü olarak kullanılmıştır. Mikrotitrasyon plakları hafifçe çalkalanarak bakteriler 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda mikroorganizma üremesi ile oluşan bulanıklık dikkate

alınarak hiç bulanıklığın olmadığı, diğer bir ifade ile üremenin görülmediği en düşük konsantrasyondaki madde miktarını içeren dilüsyon minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK, µg/mL) olarak belirlenmiştir.

3.2.1.5.Vankomisin HCl'ün HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) ile Miktar Tayini

Mikrokürelere yüklenen ve in vitro salım çalışmalarında salınan etkin maddenin miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. HPLC analizleri, 280 nm dalga boyunda USP 30-NF 25'te belirtilen HPLC koşullarında yapılmıştır (Tablo 3.1., 3.2.). Buna göre, mobil faz olarak fosforik asit ile pH'sı ayarlanmış trietilamin çözeltisi (pH 3,2) asetonitril ve tetrahidrofuran ile sırasıyla 92:7:1 oranlarında karıştırılarak A Çözeltisi, 70:29:1 oranlarında karıştırılarak B Çözeltisi hazırlanmış, Tablo 3.1.'de gösterilen HPLC koşullarında, Tablo 3.2.'de gösterilen akış profili ile çalışılmıştır.

Tablo 3.1. Vankomisin HCl'ün miktar tayininde kullanılan HPLC koşulları

Enjeksiyon hacmi	50 µL
Akış hızı	1.5 mL.dk ⁻¹
Dedektör	UV dedektör
Dalga boyu	280 nm
Sıcaklık	25 °C
Kolon	µBondapak, Waters, UK, C18, 10µm 125A, 3.9 x300 mm

Tablo 3.2. HPLC yönteminde mobil faz olarak kullanılan çözeltilerin akış şeması

Süre (dk)	A Çözeltisi (%)	B Çözeltisi (%)	Elüsyon (%)
0-12	100	0	İzokratik
12-20	100 → 0	0 → 100	Lineer gradient
20-22	0	100	İzokratik
22-23	0 → 100	100 → 0	Lineer gradient
23-30	100	0	İzokratik

Vankomisin HCl'nin miktar tayini için uygulanan ve yukarıda açıklanan bu yöntemin kalibrasyon ve validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar aşağıda sunulmuştur:

3.2.1.5.1. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan işlemdir. HPLC metodunun değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

- Doğrusallık (“Linearity”)
- Kesinlik (“Precision”)
- Duyarlılık (“Sensitivity”)
- Özgünlük (“Specificity”)
- Stabilité (“Stability”)

3.2.1.5.1.1. Doğrusallık (“Linearity”)

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirli bir aralıkta, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının direkt olarak orantılı olmasını sağlama özelliğidir.

Analitik validasyon için gerekli doğrusallık parametresini göstermek üzere,

vankomisin HCl'ün PBS (pH 7,4) içerisinde hazırlanan 200 µg/ml konsantrasyondaki altı adet stok çözeltisi hazırlanmıştır. Her bir stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 0,5-128 µg/ml konsantrasyon aralığında (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 µg/ml) dokuz standart çözelti hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşılık elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.1.5.1.2.Kesinlik (“Precision”)

Belirlenen şartlarda yapılan bağımsız test sonuçları arasındaki uyumu ifade eden bir validasyon kriteridir. Standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) ile ifade edilen analitik yöntem kesinliği, istatistiksel olarak anlamlı sayıda aynı konsantrasyondaki örneklerin absorpsiyon değerlerinin ardarda ölçülmesi ile değerlendirilir. Kesinlik, normal deney koşullarında bir analitik yöntemin tekrar edilebilirlik (repeatability) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) derecesinin ölçüsüdür.

- **Tekrar Edilebilirlik**

Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin tespiti için, kalibrasyon çalışmalarında hazırlanan çözeltilerden orta konsantrasyon 16 µg/ml seçilmiş ve bu konsantrasyondaki standart çözeltinin arka arkaya altı kez HPLC analizi yapılmıştır. Elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için varyasyon katsayısının %2'den küçük olması gerekmektedir.

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

Tekrar elde edilebilirlik parametresinin değerlendirilebilmesi amacıyla, hazırlanan ana stoktan hareketle seyreltme ile elde edilen orta konsantrasyondaki (16 µg/ml) standart çözeltiden altı adet hazırlanmış ve HPLC analizi yapılmıştır. Elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalaması, standart sapması ve varyasyon

katsayısı hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için varyasyon katsayısının %2'den küçük olması gerekmektedir.

3.2.1.5.1.3.Duyarlılık (“Sensitivity”)

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesine yönelik olarak saptanabilirlik ve tayin edilebilirlik sınırları incelenmiştir. Saptama sınırı (“Limit of Detection”), analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer sinyal gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir. Miktar tayin sınırı (“Limit of Quantification”) ise, analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır ve bu değer sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilir.

3.2.1.5.1.4.Özgünlük (“Specificity”)

Bir analitik yöntemin özgünlüğü, ortamda bulunan etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında etkin maddenin analiz edilebilme özelliğini göstermektedir.

Bu ölçütlerin değerlendirilmesi amacı ile formülasyonda kullanılan diğer maddelerin (kitosan jel, Pluronik jel, serratiopeptidazın çözeltisi ve boş PCL mikrokürelerin) PBS pH 7,4 ortamındaki 37°C’de bir haftalık inkübasyonu ile çözülden alınan örnekleri, vankomisin HCl’nin analiz edildiği HPLC koşullarında enjekte edilmiş ve bu maddelerin vankomisin HCl ile aynı şartlarda pik verip vermedikleri incelenmiştir.

3.2.1.5.1.5.Stabilite (“Stability”)

Vankomisin HCl’ün analiz boyunca stabilitesini incelemek üzere pH 7,4 PBS tamponu içerisinde 128 µg/ml konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmıştır. Hemen ve hazırlandıktan sonra 1. gün, 3., 5., 7., 14., 21., 28., 35. günlerde HPLC kolonuna

enjekte edilerek elde edilen piklerin şekli ve alanları karşılaştırılmıştır.

3.2.2. Serratiopeptidazın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

3.2.2.1.Serratiopeptidazın UV Spektrumu

Serratiopeptidazın, PBS pH 7,4 tamponu içerisinde, $\lambda=200-400$ nm aralığında, UV-1800 Shimadzu Ultraviyole Spektrofotometresi (Kyoto, Japonya) kullanılarak UV Spektrumu çekilmiş ve maksimum dalga boyu (λ_{max}) belirlenmiştir.

3.2.2.2.Serratiopeptidazın FT-IR Spektrumu

Serratiopeptidazın FT-IR spektrumu, Bölüm 3.2.1.2.'te anlatıldığı şekilde alınmış ve değerlendirilmiştir.

3.2.2.3.Serratiopeptidazın DSC Termogramı

Enzim özellikli madde serratiopeptidazın termal özelliklerinin belirlenmesi amacı ile DSC termogramı Bölüm 3.2.1.3.'te anlatıldığı şekilde çekilmiştir.

3.2.3. Formülasyon Çalışmaları

3.2.3.1.Boş Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) Mikrokürelerin Hazırlanması ve Partikül Büyüklüğünün Ayarlanması

Çalışmalarımızdaki mikrokürelerin hazırlanmasında biyoparçalanır, biyoyumlu ve FDA onaylı bir polimer olan Poli(ϵ -kaprolakton) kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan PCL polimerlerinin ticari olarak mevcut tipleri aşağıdaki gibidir:

- Mw 14.000 Mn 10.000
- Mn 60.000
- Mn 70.000-90.000

* *Mw*: Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı

Mn: Sayıca ortalama molekül ağırlığı

PCL mikroküre formülasyonları emülsiyon oluşturma - çözücü buharlaştırma yöntemi (S/Y/S) ile hazırlanmıştır. Mikroküre üretim yöntemi olarak emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi (70) , istenen boyutlarda ve küresel yapıda mikroküre üretilmesini sağladığı için tercih edilmiştir. Literatürde emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemine ilişkin formülasyon çalışmalarında yer alan çeşitli modifikasyonlar (69,70,112) , uygulanarak optimum koşullar tespit edilmeye çalışılmıştır. Oluşan yapıların küresel olup olmadıklarının ön değerlendirmesi, Leica ışık mikroskopunda yapılmış, sonuç ürünlerin görüntülenmesinde ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) fotoğrafları kullanılmıştır.

Temel olarak seçilen yöntem, PCL polimerinin diklorometan (DCM) içerisinde çözülmesi sonrası, yüzey aktif madde olarak uygun miktarda polivinil alkol (PVA) içeren iç su fazı ile uygun yöntemle karıştırılması sonucu ilk emülsiyonun (S/Y) oluşturulması, oluşan ilk emülsiyonun yüzey aktif madde olarak uygun miktarda PVA içeren sulu dış faz içerisinde uygun yöntem ile karıştırılması sonucu çoklu emülsiyonun oluşturulması (S/Y/S) ve organik solvanın uçurularak uzaklaştırılması sonucu oluşan mikroküre süspansiyonundan mikrokürelerin filtrasyon ile (0,2 µm'lik membran filtre kullanılarak) süzülüp yıkandıktan sonra -20 °C'de dondurulup liyofilize edilmesi ile mikrokürelerin eldesine dayanmaktadır. Yöntem üzerinde aşağıdaki modifikasyonlar yapılarak optimum formülasyona ulaşılmaya çalışılmıştır:

- Enkapsülasyonu artırmak amacı ile etkin maddeyi içerecek olan iç su fazına iki farklı konsantrasyonda yüzey aktif madde (PVA) ilave edilmiştir.
- Partikül boyutunu artırmak amacı ile polimer/organik solvan oranları ve karıştırma hızları, süreleri ve dış su fazındaki yüzey aktif madde oranları üzerinde değişiklikler yapılmıştır.

İlk partikül büyüklüğü ayarlama çalışmaları, PCL Mw 14000 polimeri kullanılarak yapılmış, elde edilen optimum karıştırma hızı, karıştırma süresi ve polimer/organik solvan oranları sabit tutulup, iç faz PVA oranları değiştirilerek PCL Mn 60000 ve PCL Mn 70.000-90.000 polimerleri ile de boş ve antibiyotik yüklü mikroküreler hazırlanmıştır. Bu amaçla ön denemelerde kullanılan PCL Mw 14000 polimeri ile hazırlanan mikrokürelerin hazırlanma koşulları Tablo'da görülmektedir. İç faz PVA oranlarına karar vermek amacı ile yapılan literatür taraması sonucu, iç

sulu fazda suda çözünen etkin maddenin enkapsülasyonunu artırmak amacı ile % 0,05 ile % 0,5 oranları arasında PVA kullanıldığı, ancak PVA oranındaki artış ile partikül büyüklüğünün de azalabileceği görülmüştür (69,70,112) . Bu nedenle, ön formülasyon çalışmalarında iç faz PVA oranı % 0,05 ve %0,1 olarak denenmiştir.

Tablo 3.3. Boş PCL Mw 14000 mikrokürelerde partikül büyüklüğünün ayarlanması için yapılan çalışmalar

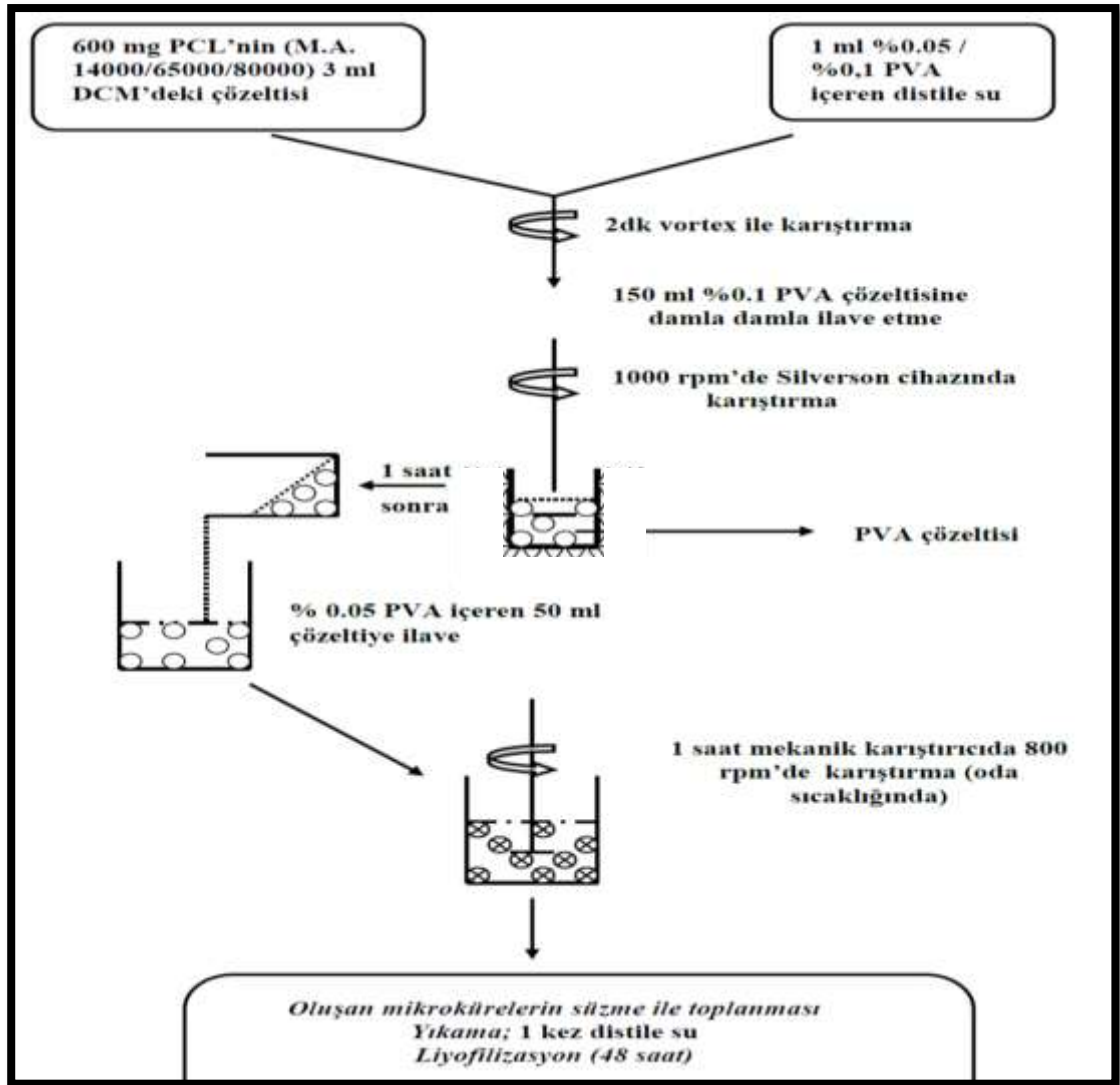
İç Faz PVA Kons.	Dış Faz PVA Kons.	PCL/DCM Oranı	Karıştırma Hızı (rpm)
%0,05	%0,05	500 mg/10 ml	1000
% 0.05	%0.5	500 mg/5 ml	1000
%0.05	%0.1	600 mg/4 ml	1000
%0.05	%0.1	600 mg/4 ml	500
%0.05	%0.1	600 mg/4 ml	1000
%0.05	%0.1	600 mg/4 ml	1000
%0.05	%0.1	600 mg/3 ml	1000
%0.1	%0.1	600 mg/3 ml	1000
%0.05	%0.1	600 mg/2 ml	1000
%0.1	%0.1	600 mg/2 ml	1000

3.2.3.2.Vankomisin HCl Yüklü PCL Mikrokürelerin Hazırlanması

PCL Mw 14000 ile yapılan ön denemeler sonrası karar verilen optimum karıştırma hızı, karıştırma süresi ve polimer/DCM oranları kullanılarak PCL Mw 14.000, PCL Mn 60.000 ve PCL Mn 70.000-90.000 polimerleri ile boş ve antibiyotik yüklü mikroküreler hazırlanmıştır.

Çoklu emülsiyonun iç fazını oluşturmak için, 3 mL DCM içinde 600 mg polimer çözdürülerek organik faz hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu organik faz %0,05 ve %0,1 oranlarında PVA ve polimer miktarının % 10 (a/a) ve % 20 (a/a)'si kadar antibiyotik çözdürülerek hazırlanan 1 ml sulu faza ilave edilerek 2 dakika boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Bu karışım, %0,1 PVA içeren 150 ml saf

suya enjektör ile iki dakika içerisinde damla damla ilave edilmiş ve 1000 rpm'de karıştırıcı kullanarak (Silverson L4RT) bir saat süre ile karıştırılarak çoklu emülsiyon oluşturulmuştur. Bu süre sonunda DCM'nin tamamını uçurmak amacı ile emülsiyon sistemi 100 ml %0,05 PVA içeren saf su ile seyreltilerek 800 rpm'de mekanik karıştırıcı(ADI) ile oda sıcaklığında bir saat karıştırılmıştır. Süre sonunda mikrokürelere içeren süspansiyon vakum ile süzülerek mikrokürelere elde edilmiş, 2 kez saf su ile yıkanarak PVA kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Elde edilen mikrokürelere -20 C°'de dondurulmuş ve 48 saat liyofilize edilmiştir. Mikrokürelere hazırlanması şematik olarak Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Emülsifikasyon/Çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının üretim şeması

Mikroküre formülasyonlarının üretiminde kullanılan PCL polimerleri, iç faz PVA oranları ve yüklenen teorik vankomisin HCl miktarları ile formülasyonlara verilen kodlar Tablo 3.4.'teki gibidir.

Tablo 3.4. VA yüklü PCL mikrokürelerinin ön formülasyon çalışmalarına ilişkin bilgiler

Kullanılan Polimer	Kullanılan PVA oranı	Kullanılan Vankomisin HCl oranı	Formülasyon Kodu
Mw 14.000	%0,05	Boş	F1B
		%10	F1
		%20	F2
	%0,1	Boş	F3B
		%10	F3
		%20	F4
Mn 60.000	%0,05	Boş	F5B
		%10	F5
	%0,1	Boş	F6B
		%10	F6
Mn 70.000-90.000	%0,05	Boş	F7B
		%10	F7
	%0,1	Boş	F8B
		%10	F8

3.2.3.3.PCL Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerin karakterizasyonu amacı ile morfolojik özellikleri, partikül büyüklüğü tayini yapılmış, üretim verimi, mikrokürelere yüklenen vankomisin HCl miktarı hesaplanmıştır. Ayrıca, mikrokürelerin DSC ile termal özellikleri de araştırılmıştır. Üretilen mikrokürelere VA salımının incelenmesi ve salım özelliklerinin değerlendirilebilmesi için *in vitro* salım çalışmaları yapılmıştır.

3.2.3.3.1. Morfolojik Özellikler

Etkin madde yüklü olan ve olmayan mikrokürelerin yüzey özellikleri SEM kullanılarak incelenmiştir. Mikroküre örnekleri, pirinç levhalar üzerine çift taraflı yapışkan olan bant ile sabitlenerek, kaplama cihazında vakum altında altın ile kaplanmıştır. Uygulanan kaplama işlemi sonrası örnekler SEM cihazına (Nova Nanosem 430) yerleştirilmiştir. Örneklerin incelenmesi sırasında 20 kV'luk voltaj uygulanmış ve farklı büyütme oranlarında mikrokürelerin fotoğrafları çekilmiştir*.

3.2.3.3.2. Mikrokürelerin Partikül Büyüklüğünün Tayini

PCL mikrokürelerinin partikül büyüklüğü tayini için Malvern Mastersizer (Hydro 2000S) aleti kullanılmıştır. Mikroküreler distile su içerisinde süspansiyon edilirdikten sonra 1 dk ultrasonikasyona tabi tutularak ölçüm yapılmıştır.

3.2.3.3.3. Mikrokürelerin Üretim Verimi

PCL mikrokürelerini hazırlamada kullanılan emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yönteminin etkinliğinin değerlendirilmesi amacı ile hazırlanan formülasyonların üretim verimi hesabı yapılmıştır. Bu amaçla, her bir serinin üretiminden sonra liyofilizasyon ile elde edilen mikroküre ağırlığı (mg olarak), üretim sırasında kullanılan etkin madde ve polimer ağırlığının toplamına oranlanmıştır. Sonuçta elde edilen bu oran yüzde cinsinden ifade edilmektedir. Her seri için elde edilen bu değerlerin ortalaması ve standart sapması bulunarak, her bir formülasyon için üretim verimi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Verim} = (A/B) \times 100$$

A: Elde edilen toplam mikroküre ağırlığı (g)

B: Etkin madde + polimer ağırlığı (g)

*SEM çekimleri Ortadoğu Teknik Üniversitesi Metalürji ve Malzeme Mühendisliği'nde yapılmıştır.

3.2.3.3.4. Mikrokürelere Yükleme Veriminin Tayini

PCL mikrokürelere yüzeyinde bulunan vankomisin HCl miktarının tespiti için, 50 mg tam olarak hassas terazide tartılmış olan PCL mikrokürelere 2 mL' lik polipropilen kapaklı-tüp içine alınmış ve üzerine 1 mL distile su ilave edilerek 20 sn vortekslenmiştir. Bu süre sonunda tüp 13500 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatant ayrılmıştır. Süpernatant 0.22 µm por çapına sahip membran filtreden süzülerek HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Mikrokürelere hapsedilen antibiyotik miktarının tespiti için çöken kısmın üzerine 1 mL metilen klorür ilave edilerek polimerin çözünmesi sağlanmıştır. Bu fazın üzerine 1 mL distile su ilave edilmiş ve 2 dakika vorteksleme ile ekstraksiyon yapılarak antibiyotik su fazına geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra su fazı 0.22 µm por çapına sahip membran filtreden süzülerek HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Elde edilen eğri altı alan değerleri kalibrasyon doğrusu denkleminde yerleştirilerek, bu eğri altı alan değerine karşılık gelen konsantrasyon saptanmış ve bu şekilde etkin maddenin toplam yükleme etkinliği hesaplanmıştır.

3.2.3.3.5. Mikrokürelere Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

3.2.3.3.5.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Hazırlanan mikroküre formülasyonlarından F8 formülasyon kodlu mikrokürelere FT-IR spektrumları, Bölüm 3.2.1.2.'de anlatıldığı şekilde ATR (attenuated total reflectance) kullanılmak sureti ile FT-IR/FT-Raman (Bruker IFS 66V/S) spektrofotometresinde, 400-4000 cm^{-1} aralığında alınmış olup, dalga sayısı cm^{-1} cinsinden değerlendirilmiştir.

3.2.3.3.5.2. DSC Analizi

Hazırlanan mikrokürelere termal özelliklerinin araştırılması için Bölüm 3.2.1.3.'te anlatıldığı şekilde Perkin Elmer Diamond DSC cihazı ile DSC analizleri

yapılmıştır. Analiz kapsamında, etkin madde içeren ve içermeyen F8 formülasyon kodlu mikroküre formülasyonlarının, VA'nın ve polimerlerin -65 - 150 °C aralığında DSC termogramları çekilmiş ve incelenmiştir.

3.2.3.3.6. Mikrokürelere *İn Vitro* Salım Deneyleri

PCL mikrokürelere *in vitro* ilaç salım çalışmaları "Diyaliz Torbası Yöntemi" kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.3.6.1. Antibiyotik Yüklü PCL Mikrokürelere Vankomisin HCl Salımının Tespiti

Antibiyotik yüklü PCL mikrokürelere VA salım deneyleri Maheshwari ve diğerleri (85) tarafından kullanılan diyaliz membran yönteminde modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Salım deneylerinde, hazırlanan mikrokürelere VA salım özelliklerinin incelenmesi için kullanılan ortam, *in vivo* ortamı en iyi şekilde taklit etmesi nedeni ile PBS (pH 7.4) tamponudur. Çalışmalarda antibiyotik yüklü ve boş PCL mikrokürelere (kontrol grubu) 100'er mg tam tartım ile alınarak diyaliz zarı (300 000, MWCO) içerisine yerleştirilmiş ve 0,5 ml PBS pH 7,4 tamponu ilave edilerek mikrokürelere süspansiyon ortamı sağlanmıştır. Sistem 10 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak dış ortam olarak 2 ml PBS pH 7,4 tamponu ilave edilmiş ve düzenek sıcaklığı $37 \pm 0,5$ °C'de sabit tutulan, 50 rpm hızda çalkalayan yatay çalkalayıcı içerisine yerleştirilmiştir.

Çalışmada, her örnek alma zamanında (1., 3., 6., 12., 24., 48., 72., ... saat) salım ortamının hepsi alınarak ölçüm yapılmıştır. Örneklerdeki antibiyotik miktarı HPLC ile tespit edilmiştir. Çalışmada her bir seri için 6 hücre kullanılmış ve her bir örnek alma zamanında hücreler arası fark olup olmadığı X, SS ve VK hesaplanarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. *İn vitro* salım çalışmalarına salım örneklerinden HPLC ile analiz sonucu saptanamaz düzeye gelene kadar devam edilmiştir.

3.2.3.3.6.2. *In Vitro* Salım Deneyleri Sonrasında Antibiyotiğin Kimyasal Stabilitesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi

Hazırlama yöntemlerinin ve enkapsülasyon işleminin PCL mikrokürelerinden salınan vankomisin HCl' ün kimyasal stabilitesi üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla elde edilen salım numuneleri üzerinde kalitatif ve kantitatif olarak HPLC analizi yapılmıştır. Salım numunelerinden elde edilen HPLC kromatogramları ve pik alanları saf maddeye ait kromatogramlar ve pik alanları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.4. Steril PCL Mikrokürelerin Hazırlanması

3.2.3.4.1. PCL Mikrokürelerinin Sterilizasyonu

Bölüm 3.3.2.'de belirtilen yöntem ile hazırlanan boş ve antibiyotik yüklü PCL mikroküreleri, *in vivo* çalışmalar için gerekli olan sterilitenin sağlanması amacı ile Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda ⁶⁰Co kaynağı kullanılarak 3.62 kGy/saat doz hızında 25 kGy (2,5 Mrad) dozda oda sıcaklığında gama radyasyon ile sterilize edilmiştir.

3.2.3.4.2. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Sterilite Kontrolü

Mikroküre formülasyonlarının sterilite kontrolleri, USP 36'da belirtilen testler doğrultusunda yapılmıştır. Mantar ve bakteri üremesine yönelik olarak iki farklı sıvı besiyeri hazırlanmıştır. Bu besiyerleri sıvı tiyoglukolat ve triptik soy buyyon (soyabean-casein broth digest) besiyerleridir. 25 kGy dozda gama radyasyon ile sterilize edilmiş mikroküre formülasyonundan 50 mg alınmış ve 12 ml steril distile suda süspande edilmiştir. Bu süspansiyondan 1 ml örnek alınarak 15 ml besiyerine ilave edilmiştir. Bütün kontroller n=6 örnek üzerinden çalışılmıştır. Besiyerleri 25 °C'de mantar ve 37 °C'de bakteri üremesinin kontrolü için 14 gün süreyle bekletilmiş ve bu süre sonunda sterilitenin değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.2.3.4.3. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerde Karakterizasyon Çalışmaları

Çeşitli çalışmalarda gama radyasyon ile sterilizasyonun mikroküre formülasyonları üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği belirtilmiştir. Olası olumsuz etkilerin tespiti amacı ile hazırlanan mikroküreler üzerinde sterilizasyon öncesi ve sonrası *in vitro* karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.2.3.4.3.1. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

Bölüm 3.3.4.1.'de anlatıldığı şekil de gerçekleştirilen gama radyasyon ile sterilizasyonun mikrokürelerin yapısal özellikleri üzerine olası olumsuz etkilerini değerlendirmek amacı ile FTIR ve DSC analizleri yapılmıştır.

3.2.3.4.3.1.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Bölüm 3.2.1.2.'te anlatıldığı şekilde, sterilizasyon sonrası F8 fomülasyon kodlu mikroküreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4.3.1.2. DSC Analizi

Bölüm 3.2.1.3.'te anlatıldığı şekilde, sterilizasyon sonrası F8 fomülasyon kodlu mikroküreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4.3.2. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Yüzey Özellikleri

Etkin madde yüklü olan ve olmayan steril PCL mikrokürelerin yüzey özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Mikroküre örnekleri, pirinç levhalar üzerine çift tarafı yapışkan olan bant ile sabitlenerek, kaplama cihazında vakum altında altın ile kaplanmıştır. Uygulanan kaplama işlemi sonrası örnekler SEM cihazına (Nova Nanosem 430) yerleştirilmiştir. Örneklerin incelenmesi sırasında 20 kV'luk voltaj uygulanmış ve farklı büyüme oranlarında mikrokürelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.3.4.3.3.Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Partikül Büyüklüğünün Tayini

Steril PCL mikrokürelerinin partikül büyüklüğü tayini Bölüm 3.3.3.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4.3.4.Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerde Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Tayini

Steril PCL mikrokürelerinin yüzeyinde bulunan vankomisin HCl miktarının tespiti Bölüm 3.3.3.4.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4.3.5.Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinden Vankomisin HCl Salımının Tespiti

Steril PCL mikrokürelerinden vankomisin HCl salımının tespiti Bölüm 3.3.3.6.1.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Salım ortamı olarak pH 7.4 PBS tamponu kullanılmıştır. Çalışmalarda antibiyotik yüklü ve boş PCL mikrokürelerden (kontrol grubu) 100'er mg alınarak diyaliz zarı (300 000, MWCO) içerisine yerleştirilmiş ve 0,5 ml PBS pH 7,4 tamponu ilave edilerek mikrokürelerin süspansiyon olmaları sağlanmıştır. Sistem 10 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak dış ortam olarak 2 ml PBS pH 7,4 tamponu ilave edilmiş ve düzenek sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış olan 50 rpm'de çalışan yatay çalkalayıcı içerisine yerleştirilmiştir.

Çalışmada, her örnek alma zamanında (1., 3., 6., 12., 24., 48., 72., ...saat) salım ortamının hepsi alınarak ölçüm yapılmıştır. Örneklerdeki antibiyotik miktarı HPLC ile tespit edilmiştir. Çalışmada her bir seri için 6 hücre kullanılmış ve her bir örnek alma zamanında hücreler arası fark olup olmadığı X, SS ve VK hesaplanarak değerlendirilmiştir. İn vitro salım çalışmalarına salım örneklerinden HPLC ile analiz sonucu saptanamaz düzeye gelene kadar devam edilmiştir.

3.2.3.4.3.6. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinden Salınan Vankomisin HCL'ün Kimyasal Stabilitesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi

Sterilizasyon işleminden sonra PCL mikrokürelerinden salınan vankomisin HCL'ün kimyasal stabilitesinin HPLC yöntemi ile incelenmesi için elde edilen salım numuneleri üzerinde kalitatif ve kantitatif olarak HPLC analizi yapılmıştır. Salım numunelerinden elde edilen HPLC kromatogramları ve pik alanları saf maddeye ait kromatogramlar ve pik alanları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.5. İlaç İçeren Termosensitif Hidrojellerin Hazırlanması ve İlaç Yüklü Jel Formülasyonları Üzerinde Sterilizasyon Öncesi ve Sonrası Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.3.5.1. İlaç İçeren Steril Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

3.2.3.5.1.1. Boş Termosensitif Kitosan Hidrojellerinin Hazırlanması

Boş termosensitif kitosan hidrojellerinin hazırlanması için, 200 mg kitosan (Fluka low-viscous) 9 ml 0.1 M HCl içinde 12 saat manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılarak çözülmüş ve buz banyosunda 5 dakika soğutulmuştur. Soğutulan bu çözeltiliye 0.5 mL gliserol-2-fosfat disodyum tuzu (β -GP)nun sudaki çözeltisi (560 mg β -GP/1,5 ml saf su) (5°C) damlalar halinde homojen çözeltili oluşuncaya kadar eklenmiş ve örnekler çok noktalı karıştırıcı ile 15 dakika karıştırılmıştır (81) .

3.2.3.5.1.2. Boş Termosensitif Pluronik Hidrojellerinin Hazırlanması

Boş termosensitif pluronik hidrojelleri “cold method” yöntemi ile Pluronic[®] F 127 kullanılarak hazırlanmıştır. Pluronic[®] F 127'nin saf sudaki % 20 (a/h) 'lik çözeltisine 12 saat +4°C'de manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakılmıştır (84) .

Jele Vankomisin HCl eklenmesi sonrası Serratiopeptidaz için gerekli pH

stabilizasyonunun sağlanması amacı ile pluronik jel pH 7,4 PBS tamponu içerisinde de hazırlanmıştır. Bu şekilde pluronik jel hazırlanmasında, pluronik'in saf sudaki %20 (a/h)'lik çözeltisi saf su yerine pH 7,4 PBS tamponu içerisinde aynı konsantrasyonda 12 saat +4°C'de manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakılması ile hazırlanmıştır. İstenilen pH stabilizasyonunun sağlanması nedeni ile sonuç formülasyonda PBS içeren pluronik jel formülasyonu kullanılmıştır.

3.2.3.5.1.3.Boş Kitosan ve Pluronik Jellerin Otoklav ile Sterilizasyonu

Boş kitosan ve Pluronik jel formülasyonlarının sterilizasyonu, 121 °C'de 15 dakika otoklav sterilizasyonu ile gerçekleştirilmiştir (113,114) .

3.2.3.5.1.4. Serratopeptidaz-VA ve VA Yüklü Steril Mikroküre İçeren Termosensitif Pluronik ve Kitosan Hidrojellerinin Hazırlanması

Serratiopeptidaz - vankomisin HCl - vankomisin HCl yüklü steril PCL mikroküre içeren steril kitosan ve pluronik termosensitif jeller, toz haldeki serratopeptidaz, antibiyotik ve steril mikrokürelerin hazırlanan steril jele steril koşullar altında ilave edilip ve 30 dakika karıştırılması ile hazırlanmıştır.

3.2.3.5.2. Jelleşme Sıcaklığının Tespit Edilmesi ve Viskozitenin Değerlendirilmesi

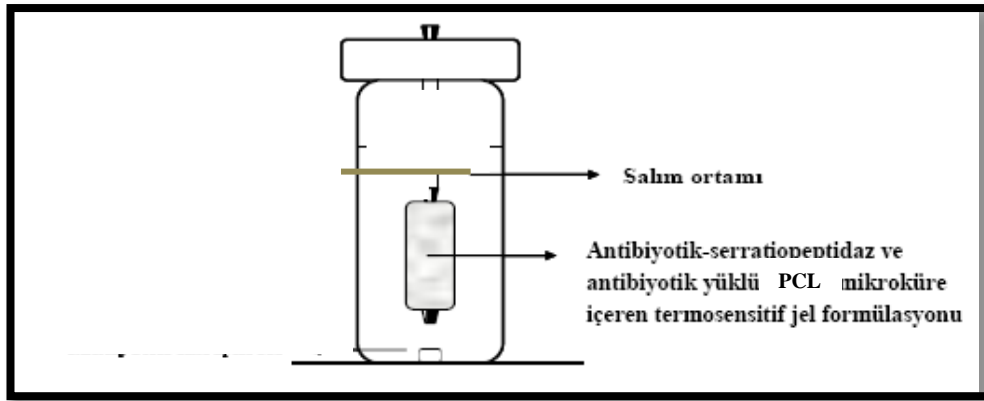
Serratopeptidaz-antibiyotik ve antibiyotik yüklü PCL mikrokürelerini içeren termosensitif hidrojellerin jelleşme sıcaklığının tespit edilmesi için, jel formülasyonları, su banyosu içerisine yerleştirilmiş ve manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak termometre kontrolünde sıcaklığı yükseltilmiş, manyetik karıştırıcının dönmeye başladığı sıcaklık derecesi sol-jel geçiş sıcaklığı olarak kaydedilmiştir.

Sol-jel geçiş sıcaklığının tespitinden sonra, jeller üzerinde reolojik ölçümler yapılmıştır. Reolojik ölçümler, sterilizasyon öncesi boş kitosan ve pluronik jeller ile, sterilizasyon sonrası boş kitosan ve boş, sadece serratopeptidaz içeren, sadece

antibiyotik içeren ve serratopeptidaz-antibiyotik ve antibiyotik yüklü PCL mikrokürelerini içeren pluronik hidrojeller üzerinde yapılmıştır. Reolojik ölçümler, 37 °C’de, Brookfield DV III Reometre ve CP51 spindle kullanılarak yapılmıştır. Tespit edilen viskozite (cP) değerleri kayma hızına (1/s) karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.2.3.5.3. İlaç Yüklü Steril Jel Formülasyonundan *In Vitro* Salım Deneyleri ve Validasyonu

In Vitro salım çalışmaları “Diyaliz Torbası Yöntemi” kullanılarak gerçekleştirilmiştir (81) (Şekil3.2.).



Şekil 3.2. İlaç yüklü steril jel formülasyonlarının *in vitro* salım çalışmalarında kullanılan düzeneğin şematik görünümü.

Salım ortamı olarak PBS pH 7.4 kullanılmıştır. Çalışmalarda serratopeptidaz-antibiyotik ve antibiyotik yüklü PCL mikrokürelerini içeren termosensitif jel formülasyonlarından 0,5 ml alınarak diyaliz zarı (300 000, MWCO) içerisine yerleştirilmiştir. Bu sistem, 2 ml pH 7,4 PBS tamponu içeren kapaklı falkon tüp içerisine yerleştirilip 37±2 °C’de 50 rpm hızla çalışmakta olan yatay çalkalayıcıya koyulmuştur. 1., 3., 6., 12., 24., 48. Saatler olmak üzere salım örneklerinden HPLC analizi ile vankomisin HCl tayin edilemeyecek düzeye ulaşincaya kadar her 24 saatte bir dış hacim tamamen alınarak yerine taze pH 7,4 PBS tamponu eklenmiştir. Alınan örnekler üzerinde, HPLC ile vankomisin HCl miktar analizi, serratiopeptidaz aktivitesi tayini, ve antimikrobiyal aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Salım deneylerinde kullanılan jel formülasyonları Tablo 3.5.’te görülmektedir.

Tablo 3.5. Salım deneylerinde kullanılan steril jel formülasyonlarına ilişkin bilgiler

Mikroküre Formülasyonu Kodu	Mikroküre Miktarı (mg)	Serbest VA Miktarı (mg)	Serratiopeptidaz Miktarı (mg)	Jel Türü (0,5 mL)	Jel Formülasyonu Kodu
F3	100	16	2,5	Kitosan	JK1
				Pluronik	JP1
F6	100	16	2,5	Kitosan	JK2
				Pluronik	JP2
F8	100	16	2,5	Kitosan	JK3
				Pluronik	JP3
	250	16	5	Pluronik	JP4
					JP5
					JP6
					JP8
200	4	25			

3.2.3.5.3.1. *İn Vitro* Salım Deneyleri Sonrasında Antibiyotik Kimyasal Stabilitesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi

Hazırlama yöntemlerinin ve enkapsülasyon işleminin hazırlanan jel formülasyonlarından salınan vankomisin HCl'ün kimyasal stabilitesi üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla elde edilen salım numuneleri üzerinde kalitatif ve kantitatif olarak HPLC analizi yapılmıştır. Salım numunelerinden elde edilen HPLC kromatogramları ve pik alanları saf maddeye ait kromatogramlar ve pik alanları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.5.3.2. *İn Vitro* Salım Deneyleri Sonrasında Serratiopeptidazın Aktivitesinin İncelenmesi

Hazırlama yöntemlerinin ve enkapsülasyon işleminin hazırlanan jel formülasyonlarından salınan serratiopeptidaz ve vankomisin HCl'in in vitro

biyoaktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla elde edilen salım numuneleri üzerinde aşağıdaki deneyler gerçekleştirilmiştir:

Serratiopeptidaz için: Hazırlanan jel formülasyonlarından zamanın fonksiyonu olarak alınan numunelerdeki serratiopeptidazın proteolitik aktivitesi Rawat ve ark. (90) tarafından geliştirilen yöntem ile gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin Validasyonu: Proteolitik aktivite substrat olarak kazein kullanılarak ölçülmüştür. 100 mM Tris pH 8 içersinde çözülmüş 0.75 mL %1 Kazein çözeltisi ile 0.1 mL proteaz örnekleri 30 dakika boyunca 30°C'ta ısıtılmıştır. Bu sürenin sonunda örneklere 0.85 mL %10 trikloroasetik asit (TCA) eklenmiş ve bu karışım 5 dakika daha 30°C'ta ısıtılmıştır. TCA ile inkubasyon sonrası örnekler 10 dakika boyunca 10000 g'de santrifüjlenmiş ve proteinden uzaklaştırılmıştır. Üst sıvının 280 nm'de absorbansı ölçülerek açığa çıkan tirozin miktarı standart grafik aracılığı ile saptanmıştır. Tirozin standardı final 1 mM olacak şekilde tampon içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Kör çözelti olarak % 10 TCA kullanılmaktadır. Standart tirozin grafiği yardımı ile açığa çıkan tirozin miktarı hesaplanmıştır.

Bir serratiopeptidaz ünitesi tanımı: Kazeinden 30°C, pH 8'de dakikada 1 mikromol tirozin üreten enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bu ünite değeri elde edilen verilerden şu şekilde hesaplanmıştır.

Ünite/ ml enzim = (micromol tyr x total hacim (ml) / enzim hacmi(ml) x dakika) x dilusyon

3.2.3.6.Hazırlanan Steril Preparatların *İn Vitro* Anti-biyofilm Aktivitesinin İncelenmesi

3.2.3.6.1. *İn Vitro* Ortamda Biyofilm Oluşturulması

In vivo deneylerde biyofilm oluşturulmuş implantlar kullanılarak medikal cihaz kaynaklı biyofilm ve osteomyelit bulguları taklit edilecektir. Bu nedenle öncelikle *in vitro* koşullarda biyofilm oluşturulmuş ve *in vitro* koşullarda ön deneysel çalışmalar yapılmıştır.

In vitro çalışmaların gerçekleştirileceği biyofilm Lellouche, et al. (115) tarafından geliştirilen yöntemle hazırlanmıştır. Yöntemde, TSB besiyerinde bir gece

inkübasyona bırakılmış *S. epidermidis* ATCC 35984 kültürü final konsantrasyonu yaklaşık 3×10^8 CFU/mL olacak şekilde seyreltilmiştir. Bu hücre kültüründen 200 µL alınarak 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağının her bir kuyucuğuna eklenmiştir. Plaklar 37 °C’de 70 rpm hızda yatay çalkalayan etüvde inkübasyona bırakılmış ve 24 saat sonunda her kuyucuk, 200 µL PBS ile adhere olmamış planktonik bakterileri uzaklaştırmak üzere yıkanmıştır.

3.2.3.6.2. *İn Vitro* Antibiyofilm Aktivitesinin İncelenmesi

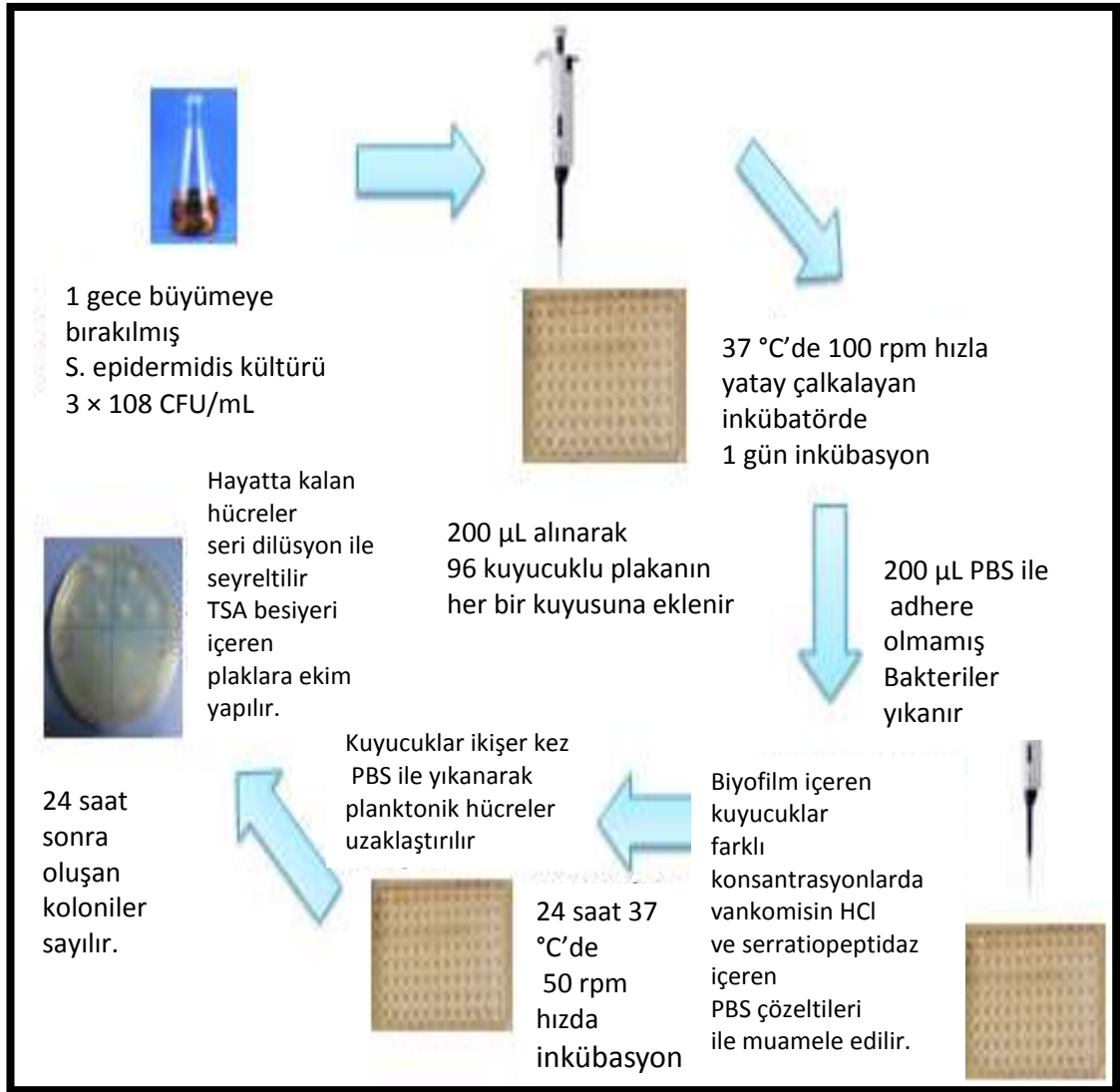
Biyofilm içeren kuyucuklar farklı konsantrasyonlarda 100 µL hacimde vankomisin HCl ve serratiopeptidaz içeren PBS çözeltileri ile 37 °C’de, 24 saat, 60 rpm hızda yatay çalkalayan inkübatörde tutulmuştur.

Çözelti veya jel ile muamele edilmeyen kuyucuklar kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Muamele sonrası, kuyucuklar ikişer kez PBS ile yıkanarak planktonik hücreler uzaklaştırılmıştır, sonrasında biyofilm, 5 dakika düşük enerjili sonikasyon uygulanması ile yüzeyden kaldırılmıştır.

Hayatta kalan hücreler seri dilüsyon ile seyreltilmiş ve TSA besiyeri içeren plaklara ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılmıştır.

Tezde kullanılan formülasyonların antibiyofilm aktivitesinin mikrotitrasyon plağında gösterilmesinden önce, farklı SP ve VA konsantrasyonlarını içeren çözelti formülasyonları kullanılarak ön denemeler yapılmıştır (Tablo 3.6.).

Ön denemeler sırasında ayrıca, serratiopeptidaz içeren PBS pH 7,4 çözeltisi ile kontrol grubu olarak sadece pH 7,4 PBS tampon çözeltisinin uygulandığı biyofilm içeren kuyucukların SEM görüntüleri çekilmiştir.



Şekil 3.3. Mikrotitrasyon plağı kuyucuklarında biyofilm oluşturulmasının şematik gösterimi

Tablo 3.6. Antibiyofilm aktivitesinin gösterilmesi için ön çalışmalarda kullanılan çözelti formülasyonları

Vankomisin HCl Konsantrasyonu	Serratiopeptidaz miktarı (VA kons.x jeldeki oran)
3 mg/mL	x 0
	X 50
	X200
256 µg/mL	X 0
	X 50
	X 200
16 µg/mL	X 0
	X 50
	X 200
256 µg/mL	X 0
	x 10
	X 25
	X 50

3.2.3.6.2.1. İlaç Yüklü Jel Formülasyonlarının Antibiyofilm Aktivitesinin Gösterilmesi

Bölüm 3.2.3.6.2.'de anlatılan yöntemle tezde kullanılan steril pluronik jel formülasyonlarının antibiyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Hazırlanan bu formülasyonların kodları ve içerikleri Tablo 3.7.'de görülmektedir. (Antibiyofilm aktivitesi en yüksek bulunan formülasyon sonuç formülasyon olarak seçilmiştir.)

Tablo 3.7. *In vitro* antibiyofilm aktivite testinin yapıldığı steril ilaç yüklü jel formülasyonları

FORMÜLASYON KODLARI	İÇERİKLERİ (0,5 mL Pluronik Jel)
JP8	200 mg MK 25 mg SP 4 mg VA
JP11	100 mg MK 25 mg SP 4 mg VA
JP9	200 mg MK 50 mg SP 4 mg VA
JP12	100 mg MK 50 mg SP 4 mg VA
JP7	200 mg MK 0 SP 4 mg VA
JP10	100 mg MK 0 SP 4 mg VA

3.2.3.6.3. Steril Sonuç Jel Formülasyonunda Kullanılan Enzim-Antibiyotik-Polimerler Arasındaki Olası Etkileşimlerin İncelenmesi

Saf haldeki VA, SP ve VA yüklü F8 fomülasyon kodlu PCL mikroküre ile pluronik jel ve steril sonuç pluronik jel fomülasyonunun; Bölüm 3.2.1.3.'te anlatıldığı gibi DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Pluronik jel ve steril sonuç jel formülasyonları yarı katı formda olmaları nedeniyle, formülasyonlar hazırlanmalarını

takiben 24 saat +4°C’de buzdolabında bekletildikten sonra, -80 °C’de dondurularak liyofilize edilmiştir. Liyofilize toz halinde elde edilen formülasyonlar DSC analizleri gerçekleştirilmiştir.

Analizler sonrası elde edilen bulgular karşılaştırılarak enzim-antibiyotik-polimerler arasında olası bir fizikokimyasal etkileşim olup olmadığı değerlendirilmiştir.

3.2.3.6.4. Steril Sonuç Jel Formülasyonunun *In Vitro* Salım Deneyleri

Antibiyofilm aktiviteleri denenenen ilaç yüklü steril jel formülasyonlarından antibiyofilm aktivitesi en yüksek bulunan formülasyon ile *in vitro* salım deneyleri Bölüm 3.2.3.5.3.’te anlatıldığı yöntem ile yapılmış ve salım örnekleri üzerinde *in vitro* VA salım profili, salım numunelerindeki SP’nin enzim aktivitesi, salım numunelerindeki VA’nın antimikrobiyal aktivitesi ve salım numunelerinin antibiyofilm aktivitesi deneyleri yapılarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.6.4.1. Steril Sonuç Jel Formülasyonundan VA Salım Profili

In vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen sonuç jel formülasyonundan *in vitro* koşullarda VA salım profilinin değerlendirilmesi amacı ile Bölüm 3.2.3.5.3.1.’de anlatıldığı şekilde salım numunelerinden HPLC ile VA miktar analizi yapılmış ve salım profili değerlendirilmiştir.

3.2.3.6.5. Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan SP’nin *in vitro* Aktivitesinin Değerlendirilmesi

In vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen sonuç jel formülasyonu üzerinde yapılan *in vitro* salım çalışmaları ile elde edilen salım numunelerindeki SP’nin aktivitesinin değerlendirilmesi amacı ile Bölüm 3.2.3.5.3.2.’de anlatıldığı şekilde salım örnekleri üzerinde enzim aktivitesi tayini yapılmıştır.

3.2.3.6.5.1. Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Vankomisin Hidroklorürün Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi

Hazırlanan ilaç yüklü steril sonuç jel formülasyonundan salınıp *in vitro* salım ortamına geçen antibiyotiğin antimikrobiyal aktivitesinin kantitatif olarak değerlendirilmesi için sıvı dilüsyon yöntemi kullanılmıştır ve Bölüm 3.2.1.5.'te anlatıldığı şekilde çalışılmış, konsantrasyonu bilinen VA çözeltileri yerine salım örnekleri kullanılmıştır (116) .

3.2.3.6.5.2. Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Salım Örneklerinin *in vitro* Antibiyofilm Aktivitesinin İncelenmesi

Antibiyofilm aktiviteleri denenenen ilaç yüklü steril jel formülasyonlarından antibiyofilm aktivitesi en yüksek bulunan formülasyon ile *in vitro* salım deneyleri Bölüm 3.2.3.5.3.'te anlatıldığı yöntem ile yapılmış ve salım örneklerinin antibiyofilm aktivitesi Bölüm 3.2.3.6.2.'de anlatılan yöntemle, salım örnekleri kullanılarak gösterilmiştir.

3.2.4. *In vivo* Pilot Çalışmalar

Bu tez bir TÜBİTAK 1002 Projesidir. Proje kapsamında *in vivo* çalışmaların yapılması planlanmış; ancak *in vitro* çalışmalar sırasında karşılaşılan problemlerin çözümü vakit aldığı için, tez süresince sadece *in vivo* pilot çalışmalar yapılabilmektedir.

3.2.4.1. *In Vivo* Çalışmalarda Kullanılacak Biyofilm Kaplı İmplantların ve Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

In vivo çalışmalarda kullanılacak biyofilm ve bakteri süspansiyonunun oluşturulması için implantlar plazma sterilizasyonunu ve sterilizasyon kontrolü yapılmıştır. *S.epidermidis* ATCC 35984 suşunun 37 °C'de triptik soy broth sıvı besiyerinde (TSB) bir gecelik kültüründen McFarland 0,5 bulanıklığa sahip (~ $0,5 \times 10^8$ cfu/mL) bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve 20 mL TSB içeren erlene 500

μL eklenmiştir. Aynı erlene biyofilm ile kaplanacak olan steril implantlar eklenmiştir. Etüvde 100 rpm hızda 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonrası biyofilm oluşturmamış planktonik bakterilerin uzaklaştırılması için implantlar 3 kez steril deiyonize su ile yıkanmış ve cerrahi işleme kadar +4 °C’de steril ortamda saklanmıştır.

Bakteri süspansiyonunun hazırlanması için, biyofilm oluşturmak üzere 12 saat inkübe edilen *S.epidermidis* ATCC 35984 suşunun bakteri kültüründen elde edilen bakteriler yıkanıp 10^5 cfu/mL olacak şekilde PBS içerisinde re-süsbande edilmiş ve her bir hayvana cerrahi işlem sırasında implantların uygulandığı bölgeye enjeksiyon yolu ile 0.2 mL olacak şekilde ($\sim 2 \times 10^4$ cfu) verilmiştir.

3.2.4.2.Cerrahi İşlem ve Tedavi Uygulaması

Aşağıda özet bir şekilde deneysel bölümü sunulan in vivo hayvan çalışmalarının gerçekleştirilmesi için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu’ndan 2011/32-7 nolu izin alınmıştır.

In vivo çalışmalarda Gracia ve diğ. (117) , Efstathopoulos ve diğ. (118) ve Yin ve diğ. (119) tarafından geliştirilen yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. İn vivo çalışmalara geçmeden önce, 4 adet Yeni Zelanda Tipi Albino Tavşan (ortalama ağırlığı 2.5-3 kg) üzerinde pilot çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu pilot çalışmalarda elde edilecek veriler doğrultusunda önceden belirlenen gruplar ve tavşan sayısı takip edilerek in vivo çalışmalar gerçekleştirilecektir (Tablo 3.8.).

Tablo 3.8. Pilot çalışmalar sonrası yapılacak olan *in vivo* çalışmalar için belirlenen deney grupları

Deney Grubu Kodu	Uygulanacak Formülasyonlar	Tavşan Sayısı
AP.1.	VA ve VA yüklü yüksek molekül ağırlıklı PCL mikroküresi içeren Pluronic®127 termosensitif jel formülasyonunun uygulandığı grup	(Antibiyotik Grubu) n= 5
AP.2.	Serratiopeptidaz-antibiyotik ve antibiyotik yüklü PCL mikroküresi içeren Pluronic®127 termosensitif jel formülasyonunun uygulandığı grup	(Enzim+Antibiyotik Grubu) n= 5
AP.3.	Boş PCL mikroküresi içeren boş Pluronic®127 termosensitif jel formülasyonunun uygulandığı grup	(Kontrol Grubu) n= 4

Cerrahi işlemden önce tavşanlara i.m. olarak Ketamin/Ksilazin (35/5mg/kg) uygulaması ile anestezi yapılmıştır. *İn vivo* deneyler boyunca tavşanların sol diz eklemleri üzerinde çalışılmıştır. Anestezi sonrasında femur çevresindeki operasyon alanı dezenfekte edilmiş ve femurda bir insizyon yapılmıştır. 18 G iğne ucu kullanılarak (1.2 x 40 mm) proksimalden distale olacak şekilde delinmiş ve oluşan kaviteye yukarıda belirtilen biyofilm (*Staphylococcus epidermidis* suşu) taşıyan implant yerleştirilmiş ve 0.2 mL bakteri süspansiyonu (*Staphylococcus epidermidis* suşu) bu kaviteye inoküle edilmiştir. Daha sonra insizyon steril cerrahi suture ile dikilip kapatılıp dezenfekte edilmiştir. Osteomyelit grubu olarak kullanılacak olan 1 No'lu tavşana (osteomyelit grubu) başka işlem uygulanmazken, 2,3 ve 4 No'lu tavşanlara (tedavi grubu) bölgenin dikişle kapatılmasını takiben 0,2 mL ilaç içeren steril pluronik jel enjekte edilmiştir. Buna göre *in vivo* deney grupları şu şekilde olmuştur:

- AP.1. Sadece bakteri süspansiyonu uygulanan grup (Osteomyelit Grubu) n=1

- AP.2. Serratiopeptidaz-antibiyotik ve antibiyotik yüklü PCL mikroküresi içeren Pluronic®127 termosensitif jel formülasyonunun uygulandığı grup (Tedavi Grubu) n= 3

Deney sonrasında, postoperatif enfeksiyon gelişimine karşı tavşanlara i.m. Deposilin (1.200.000 IU flakon dörde bölünerek enjekte edilmiştir) uygulanmıştır.

3 hafta sonra tavşanlara CO₂ kabininde tutularak ötenazi uygulanmıştır. Ötenazi sonrası cerrahi işlem gören bölgeler açılmış, mikrobiyolojik değerlendirme için SEM analizi yapmak amacı ile implantların bir kısmı çıkarılmış ve implantasyonun gerçekleştirildiği kemik doku ve çevre doku histolojik değerlendirmenin yapılabilmesi için kesilerek çıkarılmıştır.

3.2.4.3.Tavşanlara Tedavi Uygulamasını Takiben Yapılan Değerlendirmeler

3.2.4.3.1. Mikrobiyolojik Değerlendirme

Hazırlanan formülasyonların uygulanmasından 3 hafta sonra hayvanlara CO₂ kabininde tutma ile ötenazi uygulaması yapılarak, implantlar çıkarılmış ve implant yüzeyinde biyofilm varlığı SEM ile tespit edilerek implantasyon öncesi implantın SEM görüntüleri ile karşılaştırılmıştır.

3.2.4.3.2. Histolojik Değerlendirme

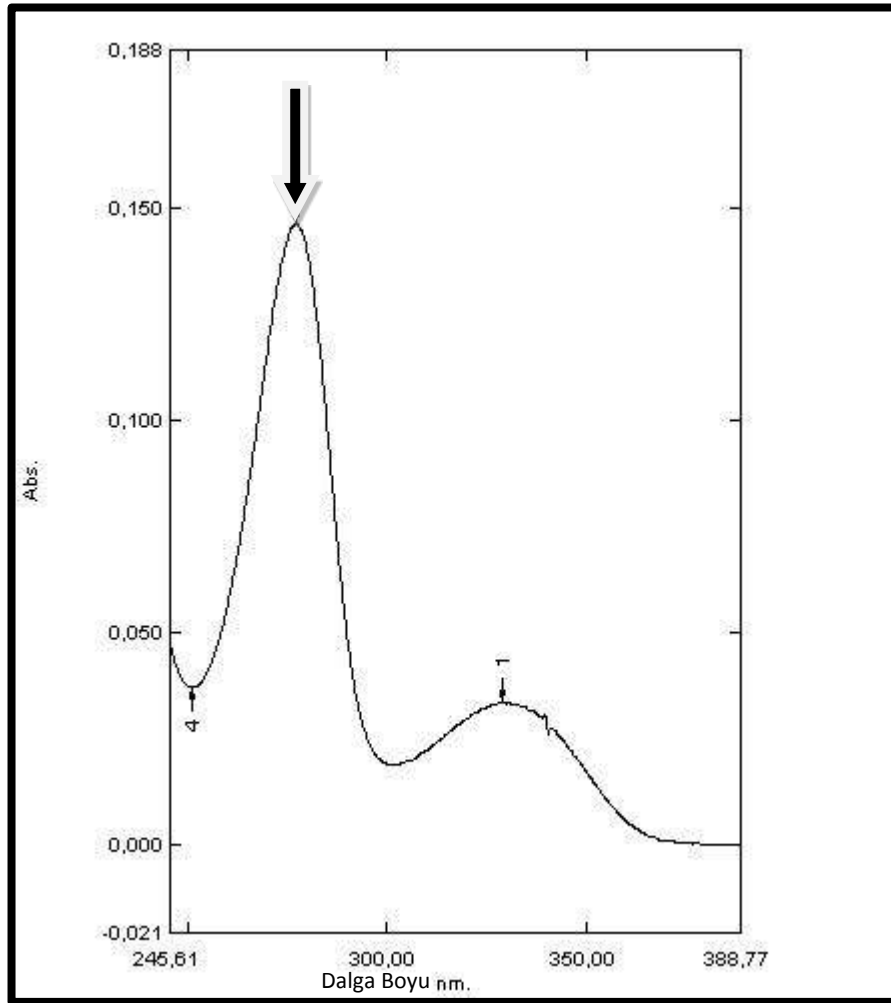
Mikrobiyolojik değerlendirmeler bölümünde bahsedilen implant çıkarma işlemini takiben çevre dokudan standart bir miktarlarda alınan örnekler formaldehit ile fikse edildikten sonra parafine gömülmüş ve hemotoksilin-eozin boyası ile boyanarak optik mikroskopta incelenecektir.

4. BULGULAR

4.1. Vankomisinin Kimyasal, Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerinin Tayini

4.1.1. Vankomisin HCl'nin UV Spektrumu

Vankomisin HCl'nin, Bölüm 3.2.1.1.'de anlatıldığı gibi PBS (pH 7,4) çözeltisinde çekilen UV spekturumunda, maksimum absorbands gösterdiği spesifik dalga boyu (λ_{\max}) 280 nm olarak gözlenmiş olup Şekilde gösterilmiştir. Bu bulgu, VA'nın literatürde belirtilen maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu ile uyumlu bulunmuştur.



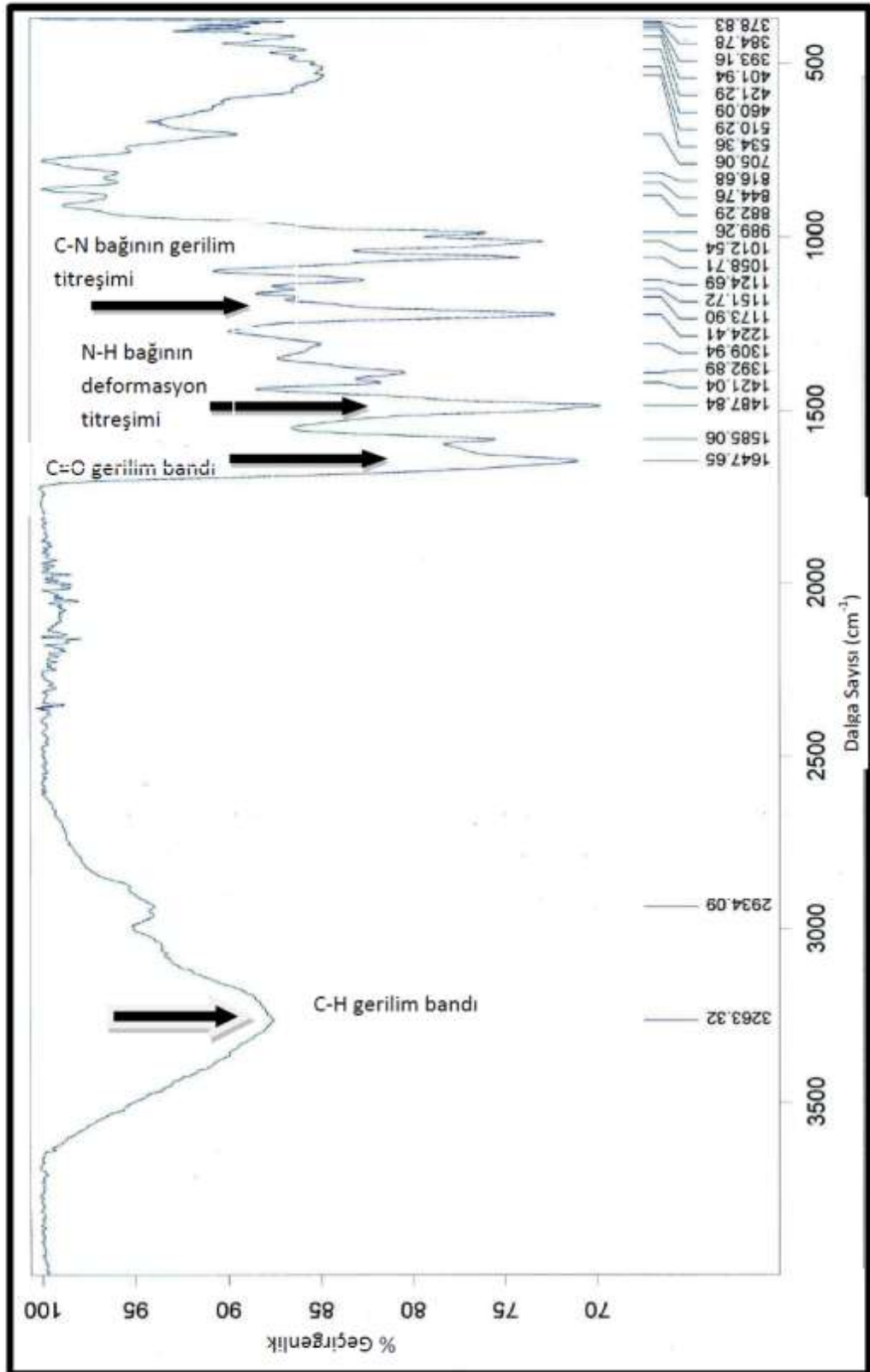
Şekil 4.1. Vankomisin HCl'nin UV spekturumu (distile su içinde çözülmüş, 200 µg/ml konsantrasyonda)

4.1.2. Vankomisin HCl'nin Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu

VA'nın FT-IR spektrumu Bölüm 3.2.1.2.'de anlatıldığı şekilde çekilmiş ve elde edilen spektrum Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. FT-IR spektrumunda gözlenen absorpsiyon bantları, VA'ya ilişkin referanstaki (120) absorpsiyon bantları ile uyum içinde bulunmuştur.

VA'nın FT-IR spektrumunda gözlenen karakteristik pikler aşağıdaki gibidir:

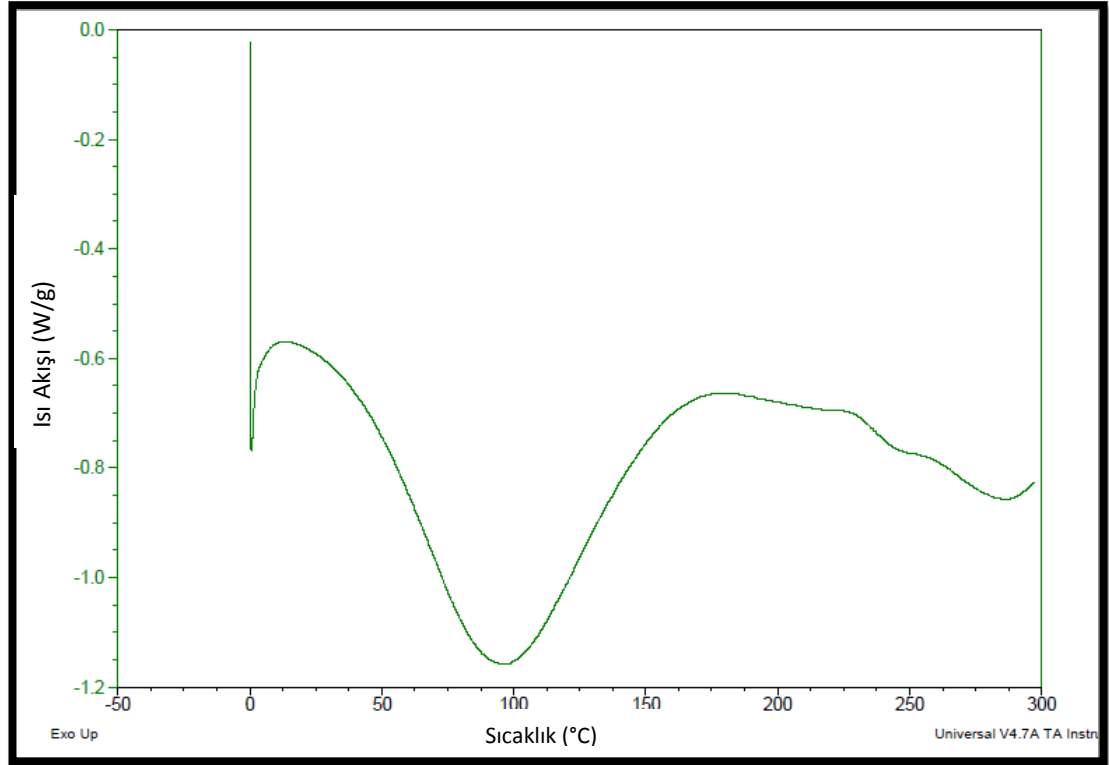
- 3263 cm^{-1} 'de görülen geniş pik C-H bağlarına ait gerilim bandıdır.
- 1647 cm^{-1} 'de görülen pik "amid 1 bandı" olarak bilinen ve 1650-1690 cm^{-1} dalga sayısı aralığında görülen, amid yapısına özgü C=O gerilim bandıdır.
- 1487 cm^{-1} 'de gözlenen pik "amid 2 bandı" olarak bilinen, amidin primer ya da sekonder olmasına göre yeri değişebilen, amid 1 pikinin yarısı, bazen 1/3'ü şiddetinde gözlenen N-H bağının deformasyon titreşimidir.
- 1224 cm^{-1} 'de gözlenen keskin pik ise 1300-1200 cm^{-1} 'de gözlenen, C-N bağının gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.2. VA'nın FT-IR spektrumu

4.1.3. Vankomisin HCl'nin Diferensiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramı

VA'nın DSC termogramı Bölüm 3.2.1.3.'te anlatıldığı şekilde çekilmiştir. Literatür ile uyumlu bulunmuştur (121) .



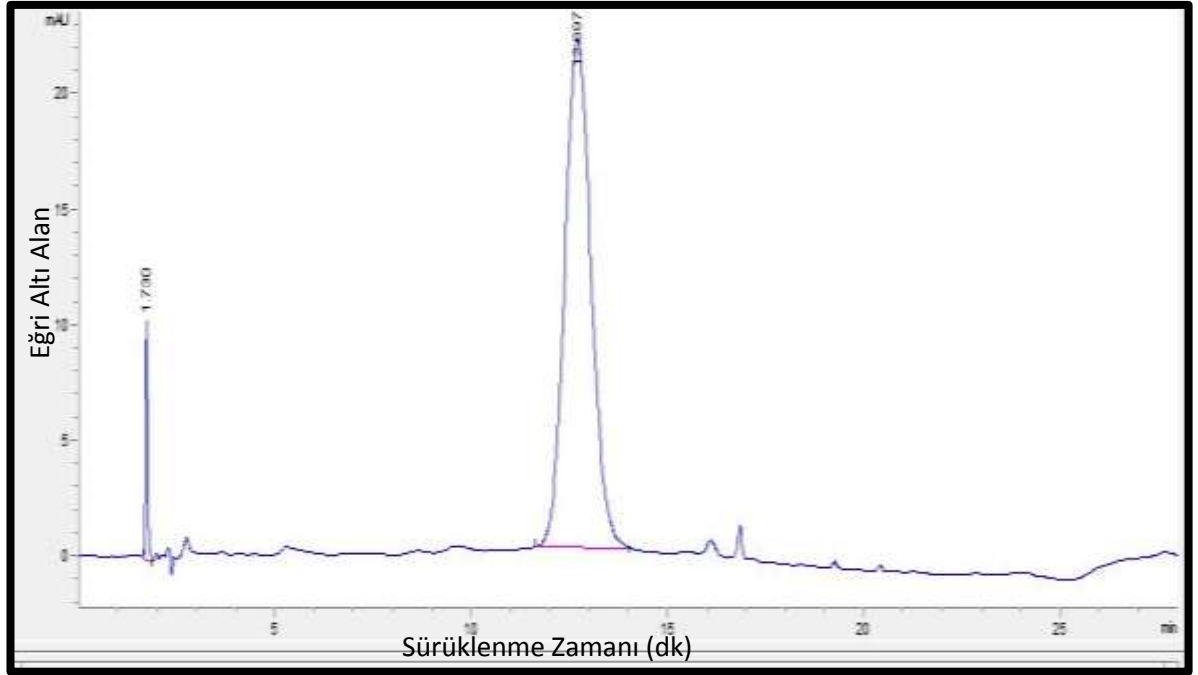
Şekil 4.3. Vankomisin HCl'nin DSC termogramı

4.1.4. Vankomisin HCl'nin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Saptanması

Vankomisin HCl'nin minimum inhibitör konsantrasyonunun saptanması Bölüm 3.2.1.4.'te anlatıldığı şekilde yapılmış ve 2 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.1.5. Vankomisin HCl'nin Miktar Tayini ve Validasyonu

Bölüm 3.2.1.5.'te belirtilen koşullarda VA'nın HPLC miktar tayini gerçekleştirilmiştir ve VA'ya ilişkin aşağıdaki HPLC piki elde edilmiştir.



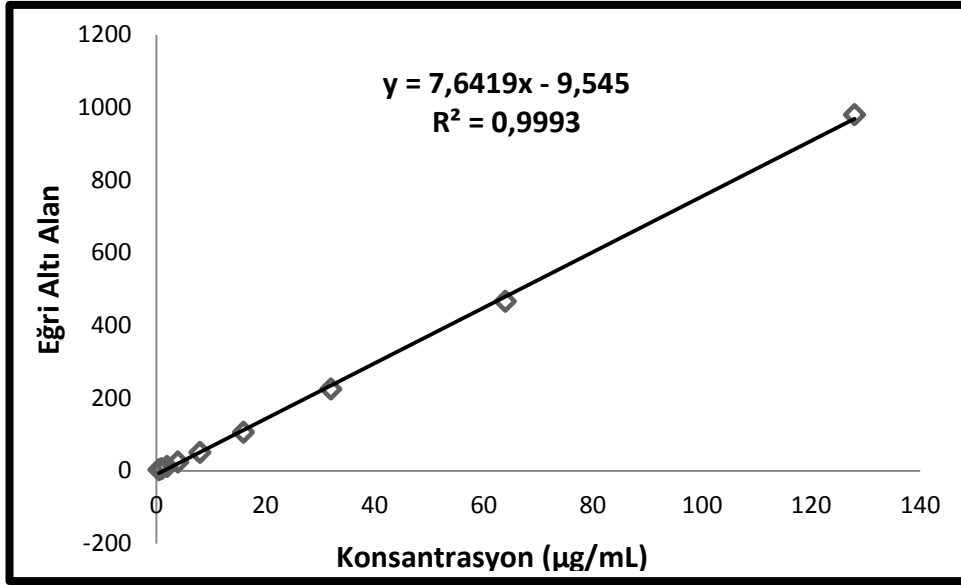
Şekil 4.4. Vankomisin HCl'ün HPLC kromatogramı (distile su içinde çözülmüş, 200 µg/ml konsantrasyonda)

4.1.5.1. Analitik Yöntem Validasyonu

4.1.5.1.1. Doğrusallık (“Linearity”)

Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması

Bölüm 3.2.1.5.1.1.'de belirtildiği şekilde hazırlanan ve herbirinde 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 µg/ml VA çözeltileri kullanılarak elde edilmiştir. Hazırlanan bu çözeltiler 280 nm'de USP 30-NF 25'te verilen akış şeması kullanılarak HPLC ile analiz edilmiştir. Elde edilen pik alanları çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusuna ait denklem lineer regresyon ile bulunmuştur (Şekil 4.5.). Elde edilen doğru denkleminin tanımlayıcılık katsayısı (regresyon katsayısı) $r^2 = 0,9993$ olarak bulunmuş ve denklemin doğrusallığı gösterilmiştir (n=6).



Şekil 4.5. Vankomisin HCl'nin kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (n=6)

4.1.5.1.2. Kesinlik ("Precision")

Bölüm 3.2.1.5.1.2.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir, sonuçlar Tablo 4.1 ve Tablo 4.2' de sunulmuştur. Hesaplanan konsantrasyonlar arası varyasyon katsayısı %2'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.1. Tekrarlanabilirlik sonuçları (n=6)

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Pik Alanı	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama \pm Standart Sapma ($x \pm ss$)	Varyasyon Katsayısı (VK)
16	103,1	14,74	14,79 \pm 0,049	0,33
16	104,1	14,87		
16	103,3	14,76		
16	103,9	14,84		
16	103,4	14,78		
16	103,5	14,79		

Tablo 4.2. Tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)

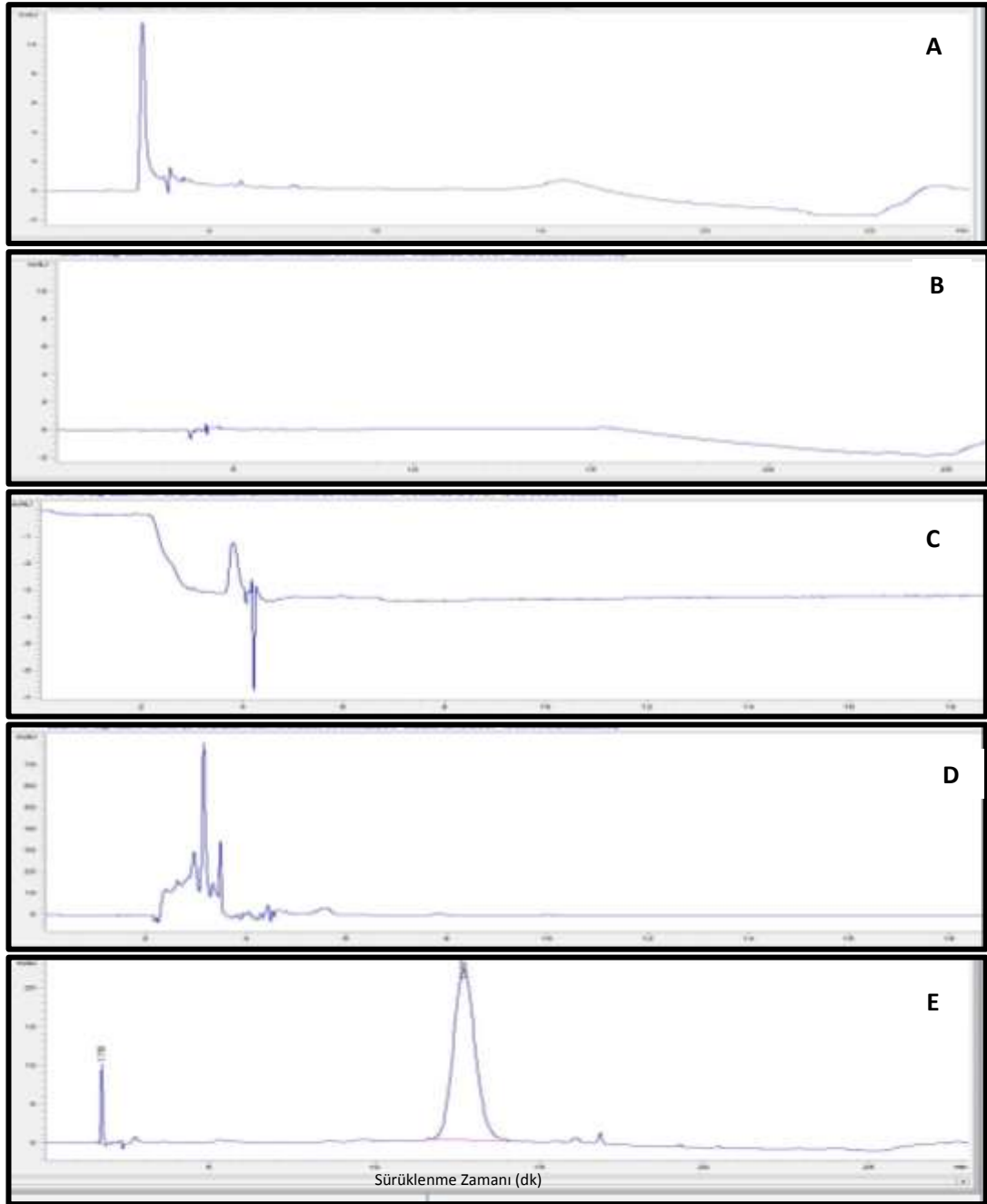
Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Pik Alanı	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ortalama \pm Standart Sapma ($x \pm ss$)	Varyasyon Katsayısı (VK)
16	100,3	14,37	14,75 \pm 0,23	1,56
16	103,1	14,74		
16	104,8	14,96		
16	105,2	15,01		
16	102,4	14,64		
16	103,4	14,77		

4.1.5.1.3. Duyarlılık (“Sensitivity”)

Bölüm 3.2.1.5.1.3.’te bildirildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Miktar tayin sınırı 0,42 $\mu\text{g/ml}$, saptama sınırı 0,21 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir (n=6).

4.1.5.1.4. Özgünlük (“Specificity”)

Bölüm 3.2.1.5.1.4.’te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan jel formülasyonunda kullanılan yardımcı maddelerin ve serratiopeptidazın VA’nın HPLC analizi koşullarında VA piki ile çakışmanın bulunmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Analitik yöntem validasyonunda özgünlük bulguları (A:kitosan, B:Pluronic, C:boş PCL mikroküre, D: serratiopeptidaz, E: vankomisin HCl)

4.1.5.1.5. Stabilité (“Stability”)

Bölüm 3.2.1.5.1.5.’te anlatıldığı şekilde, VA’nın analiz boyunca stabilitesini göstermek amacı ile 128 µg/ml konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti hazırlandıktan hemen sonra ve 1. gün, 3., 5., 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde HPLC kolonuna enjekte edilerek elde edilen piklerin şekli ve alanları karşılaştırılmıştır. Değerlendirmeler sonucunda pik zamanı, pik şekli ve pik alanlarında bir değişiklik görülmemiş olup varyasyon katsayısı %2’nin altında bulunmuştur.

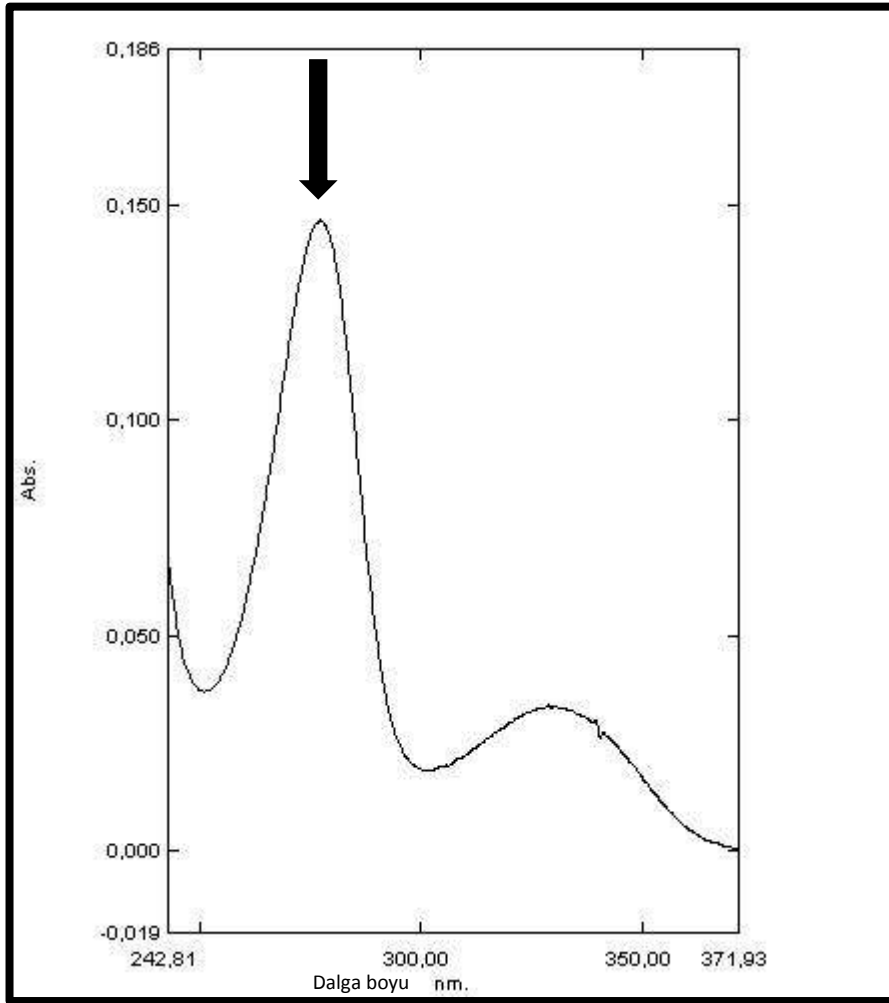
Tablo 4.3. Analitik yöntem validasyonunda VA’ya ilişkin stabilite sonuçları (n=6)

Ölçüm zamanı (gün)	Konsantrasyon (µg.mL ⁻¹)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg.mL ⁻¹) (X±SS)	% Kalan VA
0	128	127,7±0,11	100
1	128	127,5±0,09	99,8
3	128	127,3±0,10	99,6
5	128	126,8±0,09	99,2
7	128	126,1±0,08	98,7
14	128	125,2±0,12	98,0
21	128	124,2±0,10	97,2
28	128	123,6±0,07	96,7
35	128	122,8±0,05	96,1

4.2. Serratiopeptidazın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

4.2.1. Serratiopeptidazın UV Spektrumu

Serratiopeptidazın, UV spektrumu Bölüm 3.2.2.1.'de anlatıldığı gibi PBS pH 7,4 tamponu içerisinde, $\lambda=200-400$ nm aralığında, çekilmiş ve maksimum dalga boyu (λ_{max}) 280 nm olarak belirlenmiştir.

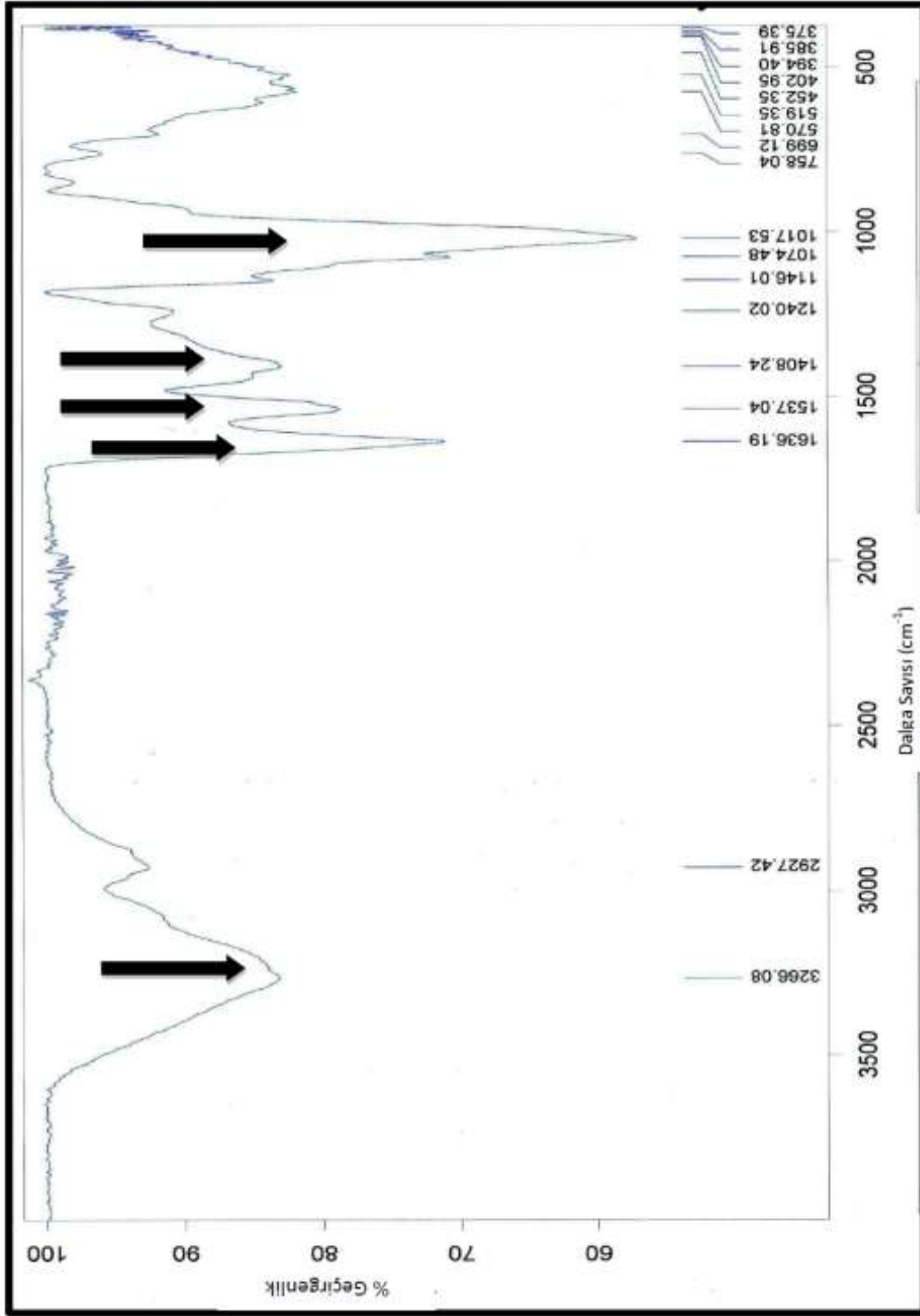


Şekil 4.7. Serratiopeptidazın pH 7,4 PBS tamponu içerisindeki UV spektrumu

4.2.2. Serratiopeptidazın FT-IR Spektrumu

Serratiopeptidazın FT-IR spektrumu, Bölüm 3.2.2.2.'de anlatıldığı şekilde, çekilmiş ve elde edilen spektrum şekilde gösterilmiştir. VA'nın FT-IR spektrumunda gözlenen karakteristik piklere ilişkin açıklamalar aşağıdaki gibidir:

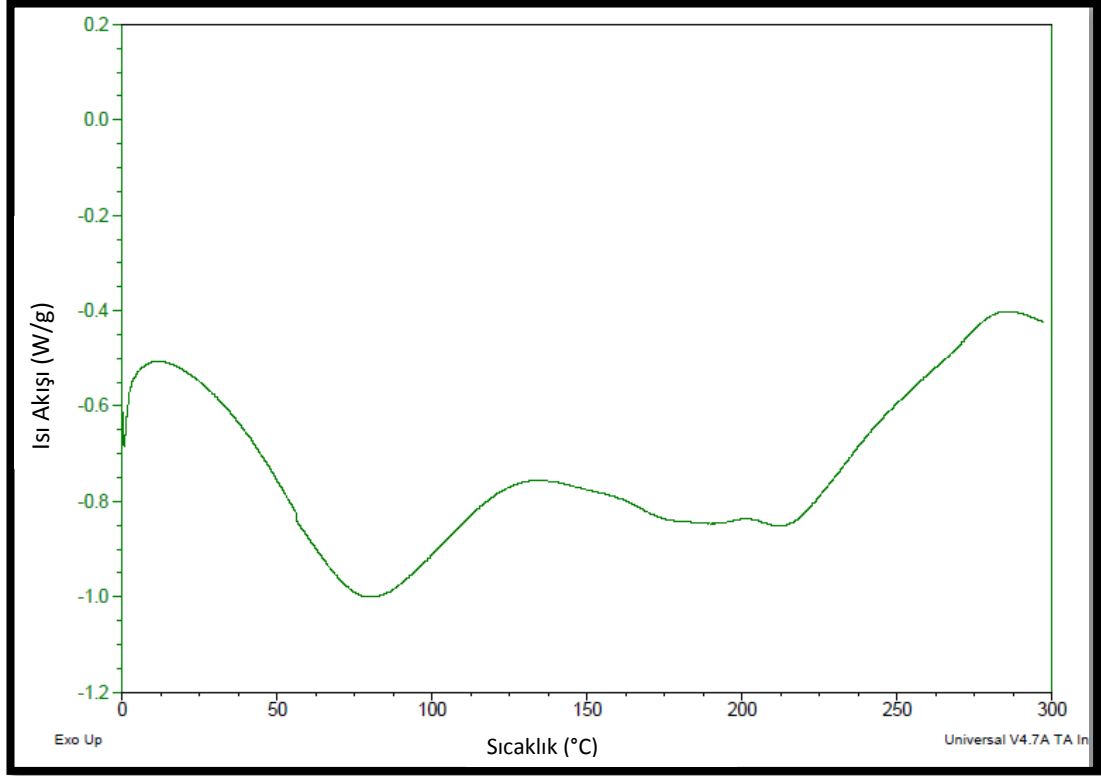
- 3266 cm^{-1} 'de görülen geniş pik C-H bağlarına ait gerilim bandıdır.
- 1636 cm^{-1} 'de görülen pik "amid 1 bandı" olarak bilinen ve 1650-1690 cm^{-1} dalga sayısı aralığında görülen, amid yapısına özgü C=O gerilim bandıdır.
- 1537 cm^{-1} 'de gözlenen pik "amid 2 bandı" olarak bilinen, amidin primer ya da sekonder olmasına göre yeri değişebilen, amid 1 pikinin yarısı, bazen 1/3'ü şiddetinde gözlenen N-H bağının deformasyon titreşimidir.
- 1408 cm^{-1} 'de gözlenen pik C-N bağının gerilim bandıdır.
- 1074 cm^{-1} 'de gözlenen pik ise 1020-1275 cm^{-1} 'de gözlenen, ester yapısına ait C-O bandıdır.



Şekil 4.8. Serratiopeptidazın FT-IR spektrumu

4.2.3. Serratiopeptidazın DSC Termogramı

Serratiopeptidazın DSC termogramı Bölüm 3.2.2.3.'te anlatıldığı şekilde çekilmiştir.



Şekil 4.9. Serratiopeptidazın DSC termogramı

4.3. Formülasyon Çalışmaları

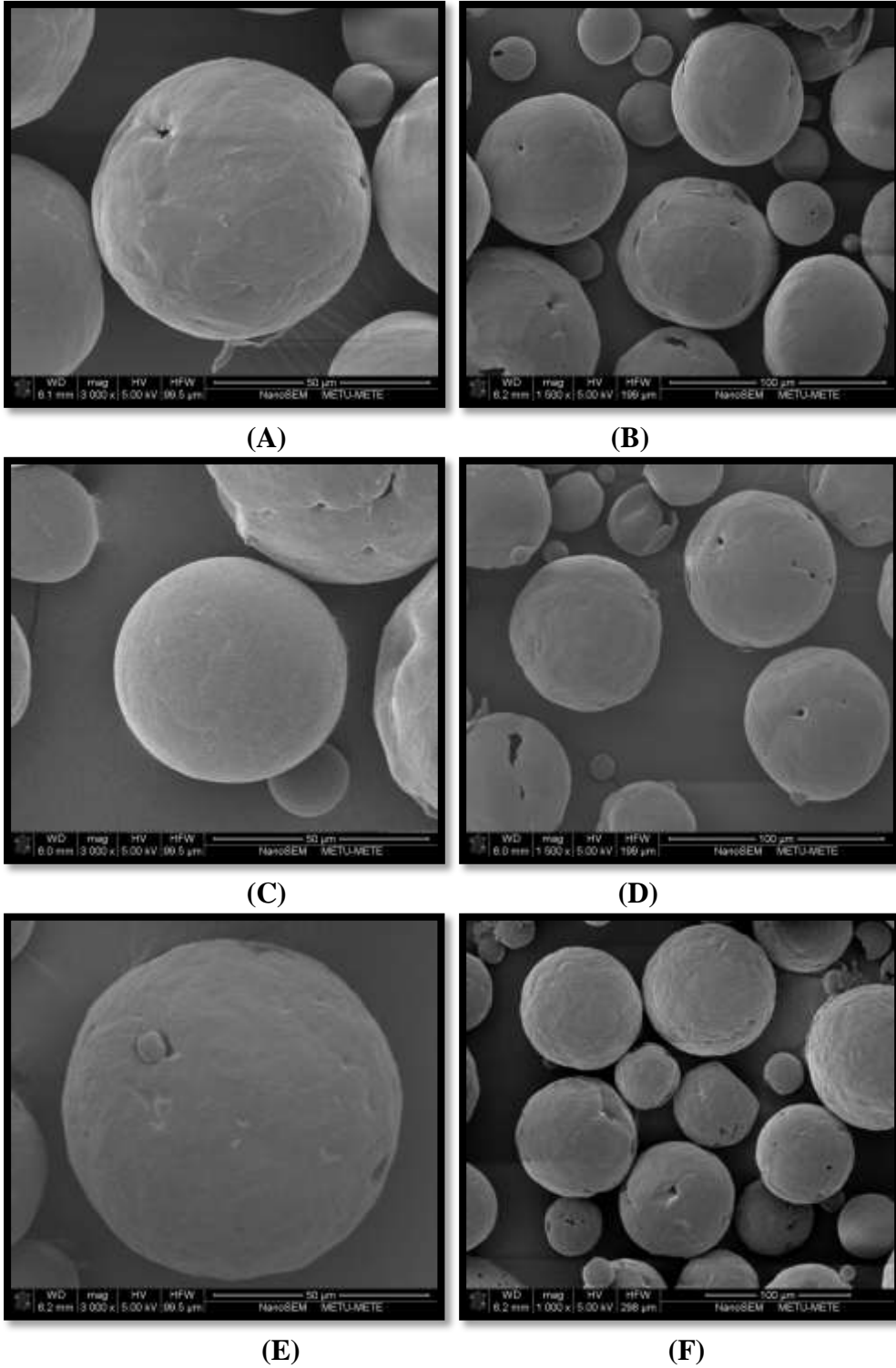
4.3.1. PCL Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu

4.3.1.1. Morfolojik Özellikler

Etkin madde yüklü olan ve olmayan mikrokürelerin yüzey özellikleri, Bölüm 3.2.3.3.1.'de anlatıldığı şekilde Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir.

SEM fotoğrafları incelendiğinde, boş veya etkin madde içeren mikrokürelerin şekillerinin küresele yakın özellik gösteren, homojen dağılımda oldukları görülmektedir.

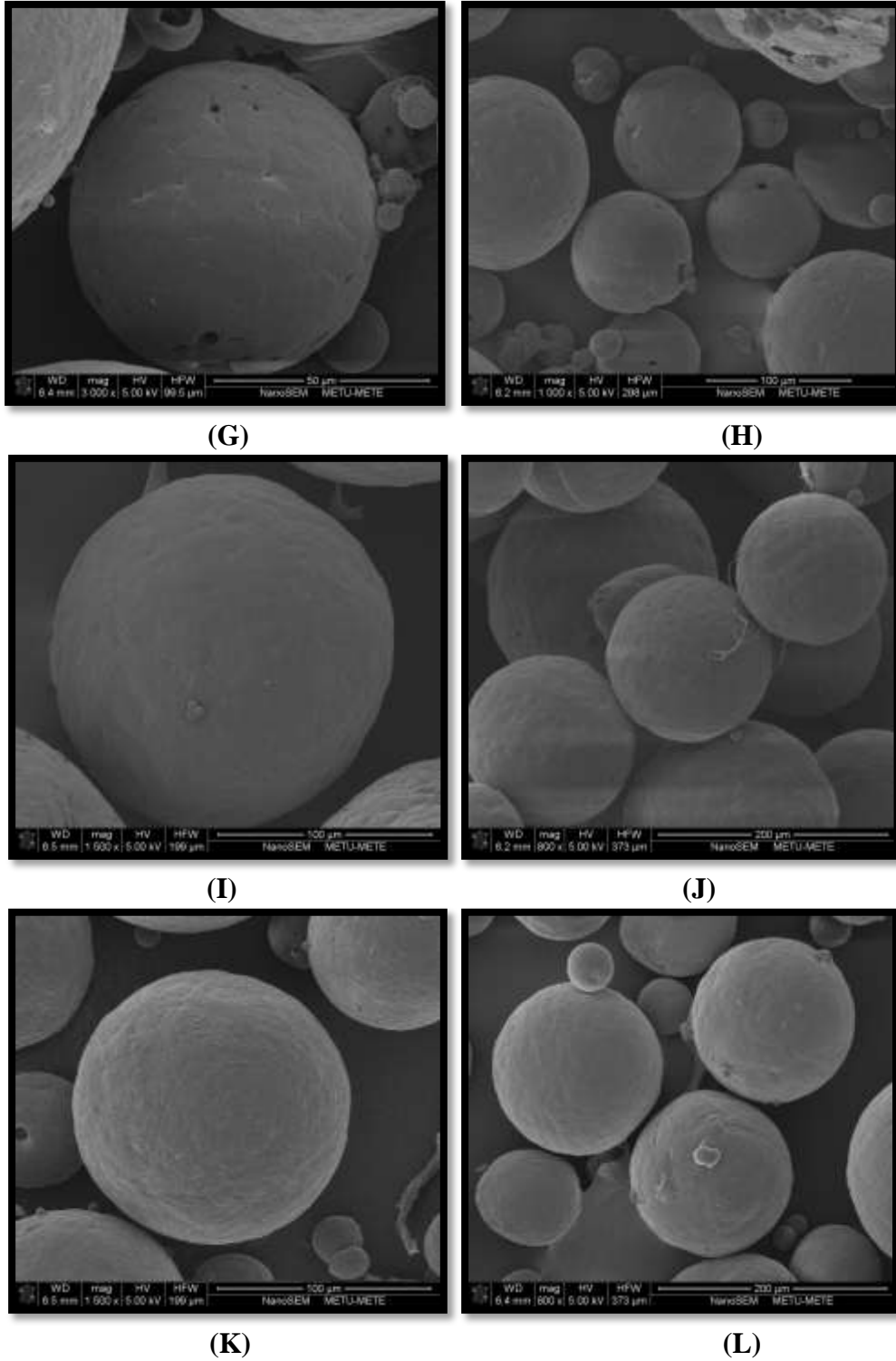
PCL Mikrokürelerin SEM Görüntüleri



Şekil 4.10. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü ve boş mikroküre formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

(A,B: F1 formülasyonu, C,D: F3 formülasyonu, E,F: F5 formülasyonu) Formülasyon kodları için bkz. Tablo 3.4)

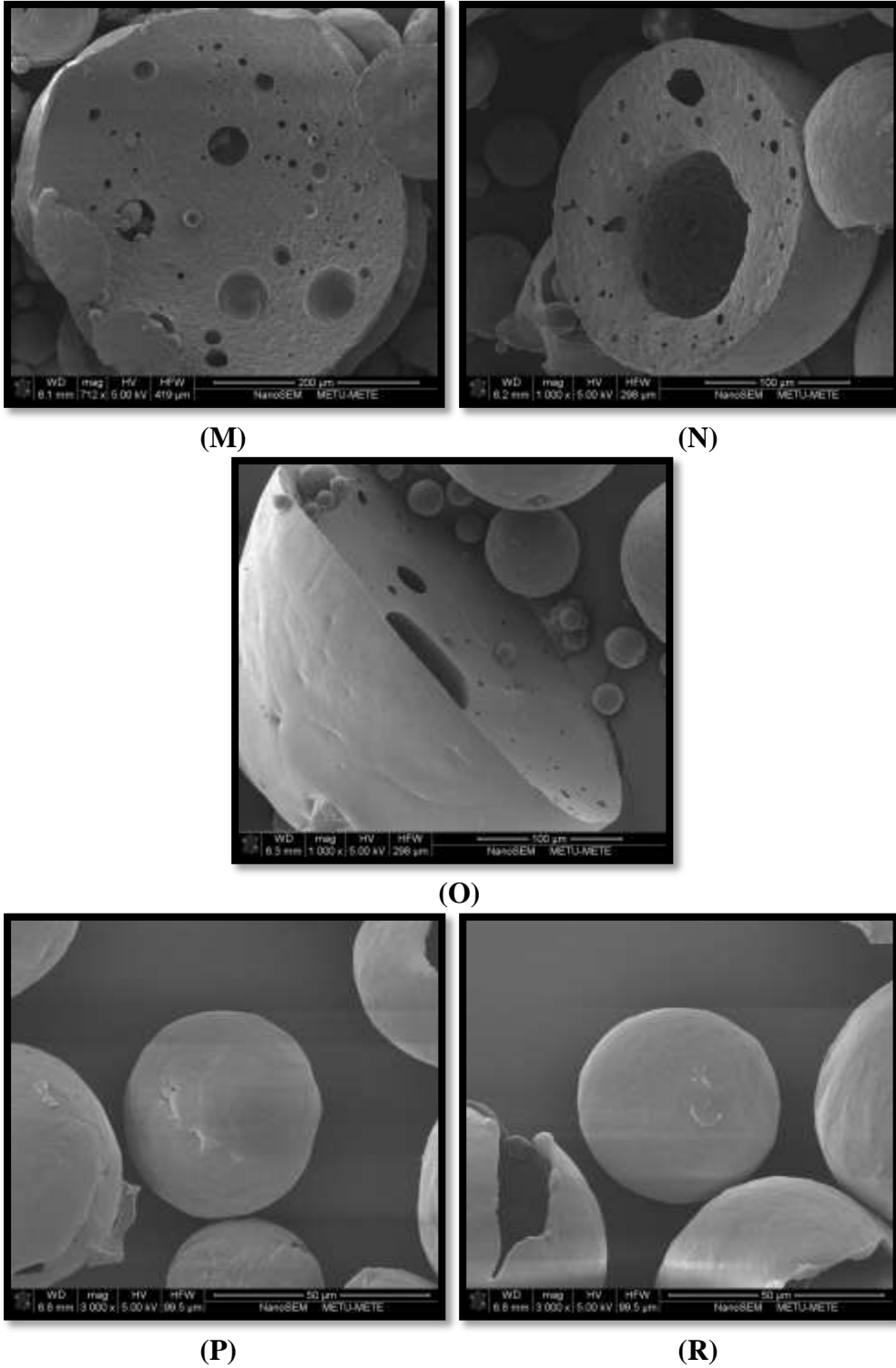
PCL Mikrokürelerin SEM Görüntüleri



Şekil 4.11. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü ve boş mikroküre formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

(**G,H:** F6 formülasyonu, **I,J:** F7 formülasyonu, **K,L:** F8 formülasyonu) Formülasyon kodları için bkz. Tablo 3.4)

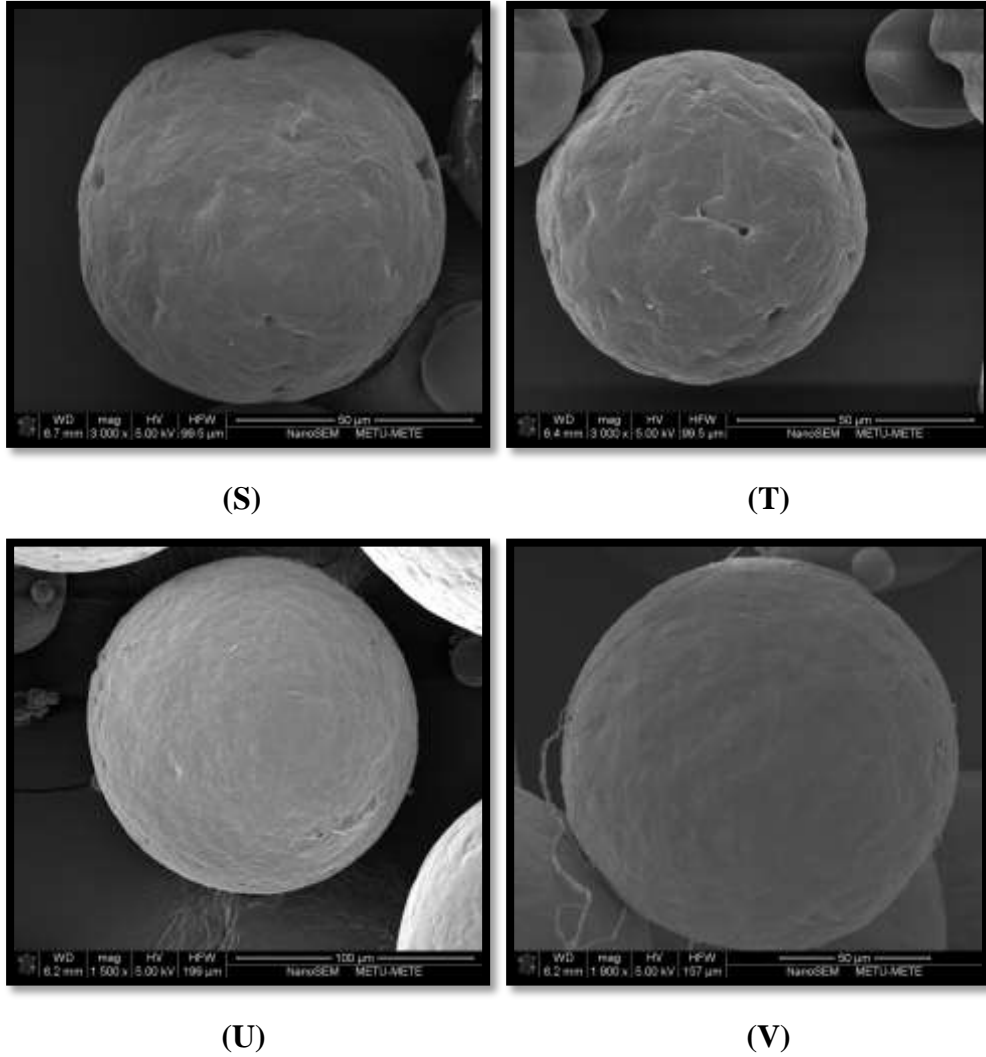
PCL Mikrokürelerin SEM Görüntüleri



Şekil 4.12. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü ve boş mikroküre formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

(M: F3 formülasyonunun iç yapısı, N: F6 formülasyonunun iç yapısı, O: F8 formülasyonunun iç yapısı, P: Boş F1 formülasyonu, R: Boş F3 formülasyonu) Formülasyon kodları için bkz. Tablo 3.4)

PCL Mikrokürelerin SEM Görüntüleri



Şekil 4.13 Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü ve boş mikroküre formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

(S: Boş F5 formülasyonu, T: Boş F6 formülasyonu, U: Boş F7 formülasyonu, V: Boş F8 formülasyonu) Formülasyon kodları için bkz. Tablo 3.4)

4.3.1.2. Mikrokürelerin Partikül Büyüklüğünün Tayini

Mikrokürelerin partikül büyüklüğü tayini Bölüm 3.2.3.3.2.'de anlatıldığı şekilde Malvern Mastersizer Hydro 2000S aleti kullanılarak yapılmıştır. Mikroküreler distile su içerisinde süspande edildikten sonra 1 dk ultrasonikasyona tabi tutularak ölçüm yapılmıştır.

Tez çalışmalarımız kapsamında hazırlanan mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklükleri incelendiğinde (Tablo 4.4.), bütün formülasyonların partikül

büyükliklerinin 54-134 μm aralığında yer aldığı görülmüştür. Mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklüğü, düşük molekül ağırlıklı PCL Mw 14000 polimeri ile hazırlanan formülasyonlarda, 58 μm civarında çıkarken, orta molekül ağırlıklı PCL Mn 60000 polimeri ile hazırlanan mikrokürelerde yaklaşık olarak 75 μm ve yüksek molekül ağırlıklı PCL Mn 70000-80000 ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarında yaklaşık 130 μm civarında çıkmıştır.

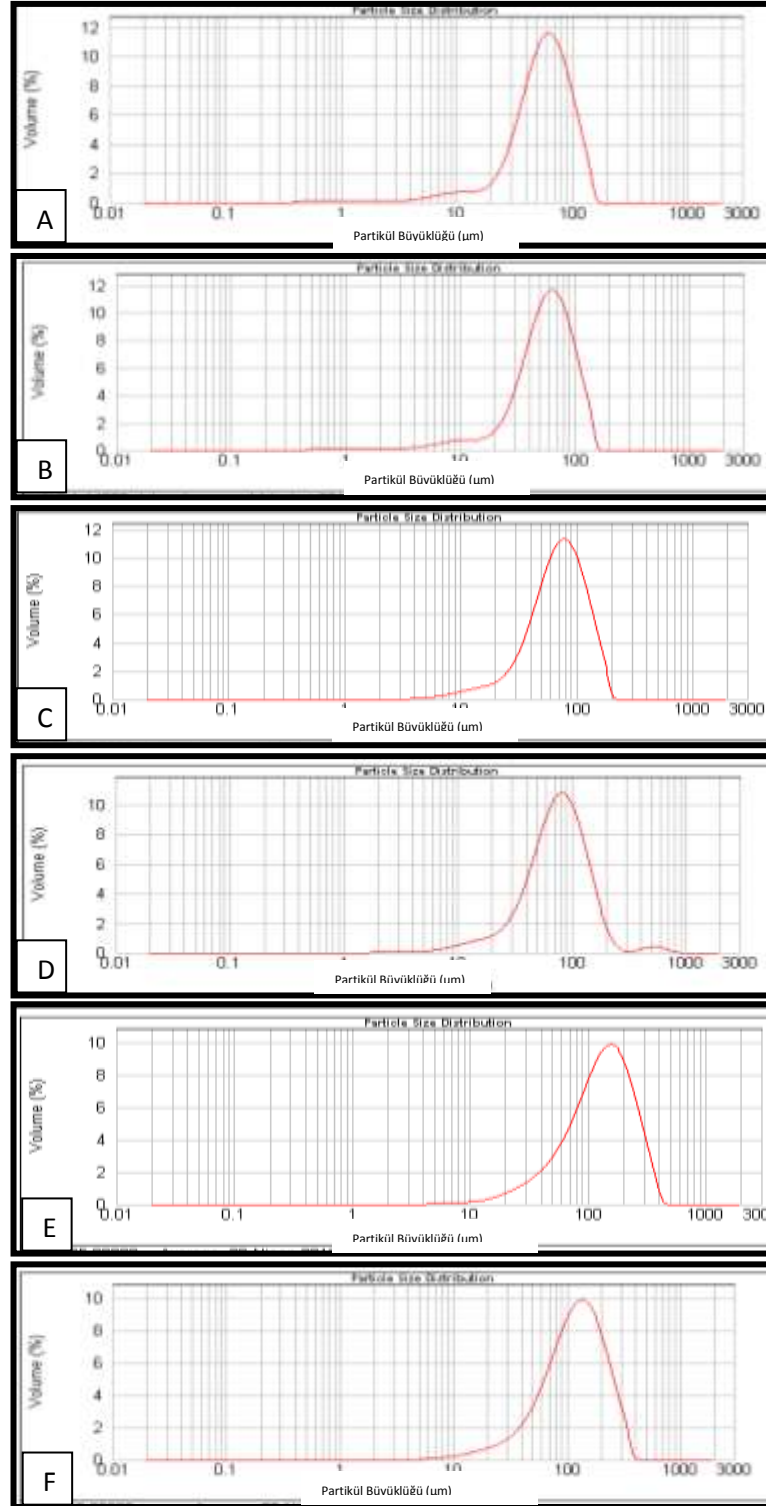
Tablo 4.4. Farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin partikül büyüklüğü değerleri

Formülasyon Kodu *	Polimer/ VA (a/a) (mg)	Partikül Büyüklüğü (μm) X \pm SS** (n=3)
F1	600 / 60	58,05 \pm 0,09
F1B	600/0	54,48 \pm 0,13
F3	600 / 60	58,08 \pm 0,10
F3B	600/0	64,57 \pm 0,17
F5	600 / 60	71,84 \pm 0,62
F5B	600/0	81,49 \pm 0,48
F6	600 / 60	76,36 \pm 1,93
F6B	600/0	71,51 \pm 0,87
F7	600 / 60	134,12 \pm 1,98
F7B	600/0	130,16 \pm 1,56
F8	600 / 60	120,15 \pm 1,43
F8B	600/0	118,69 \pm 1,81

*bkz. Tablo 3.4.

**X= Ortalama

SS= Standart Sapma



Şekil 4.14. Mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı grafikleri A) F1, B)F3, C)F5, D)F6, E)F7, F)F8 Formülasyonu (Formülasyon kodları için Bkz. Tablo3.4.)

4.3.1.3. Mikrokürelerin Üretim Verimi

Bölüm 3.2.3.3.3.'te anlatıldığı şekilde, formülsyonların üretilmesini takiben hesaplanan üretim verimleri sonuçları Tablo 4.5.'te verilmiştir. Hazırlanan mikroküre formülasyonlarına ilişkin üretim verimleri % 38,6 ile % 80,9 arasında değişmektedir.

Tablo 4.5. Farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin üretim verimi değerleri (n=3)

Formülasyon Kodu*	Üretim Verimi (%)
F1B	78,46
F1	73,11
F3B	80,96
F3	74,32
F5B	69,77
F5	59,62
F6B	62,91
F6	60,83
F7B	48,33
F7	47,51
F8B	50,87
F8	49,8

*bkz. Tablo 3.4.

4.3.1.4. Mikrokürelerde Yükleme Veriminin Tayini

Bölüm 3.2.3.3.4.'te anlatıldığı şekilde tespit edilmiştir. Yükleme verimi % 4,1 ile % 58,4 arasında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6.'da sunulmuştur.

Tablo 4.6. Farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin yükleme etkinliği değerleri (n=3)

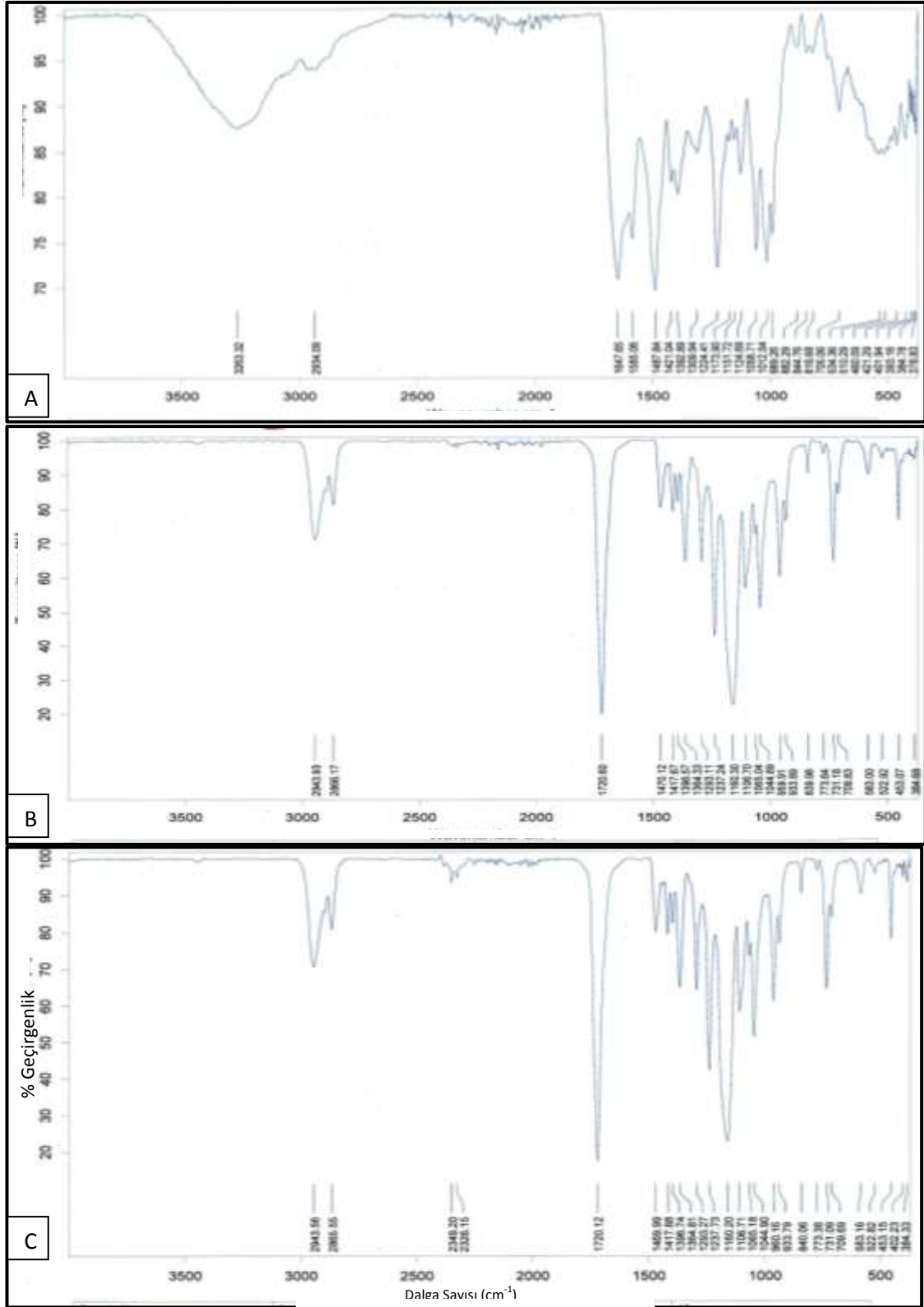
Formülasyon Kodu	Yüzeydeki % VA	İç Fazdaki % VA	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
F1	0,12	0,35	4,7
F3	0,08	0,33	4,1
F5	1,39	2,67	40,6
F6	1,05	3,66	47,1
F7	0,89	4,59	54,8
F8	0,72	5,12	58,4

4.3.1.5. Mikrokürelerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

4.3.1.5.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.3.5.1.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. PCL mikrokürelerin FT-IR spektrumlarında gözlenen karakteristik piklere ilişkin açıklamalar aşağıdaki gibidir:

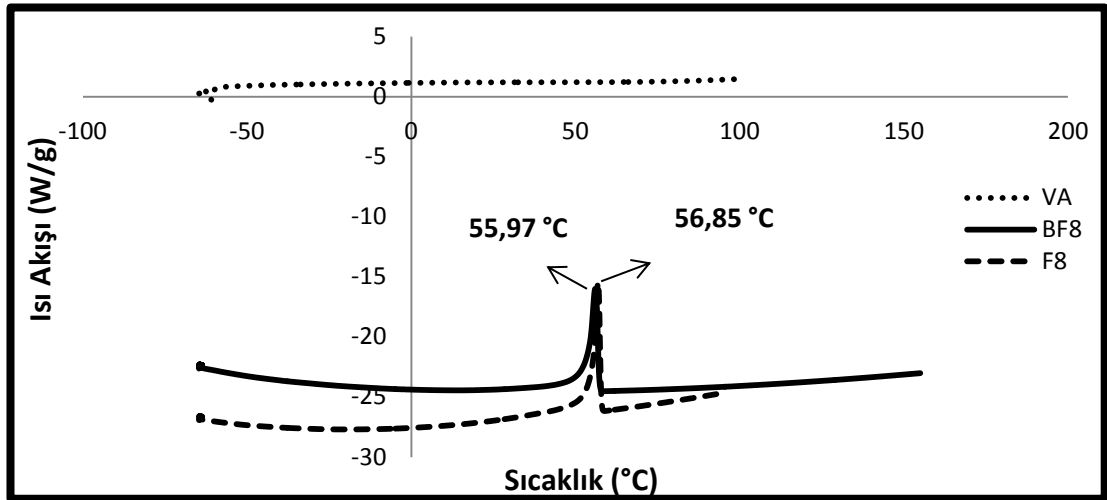
- 2943 cm⁻¹'de görülen pik karboksilik asit yapısında görülen O-H bağlarına ait gerilim bandıdır.
- 1720 cm⁻¹'de görülen pik aldehid, keton, karboksilik asit ve ester yapılarında görülen, C=O gerilim bandıdır.
- 1160 cm⁻¹'de gözlenen pik alkol, eter, karboksilik asit ve ester yapılarında bulunan C-O bağının gerilim titreşimidir.



Şekil 4.15. A:VA'nın FTIR spektrumu, **B:** Yüksek moleköl ağırlıklı PCL ile hazırlanmış boş mikroküre, **C:** VA yüklü mikroküre

4.3.1.5.2. DSC Termogramlarının İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.3.5.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.15. incelendiğinde, görülen endotermik pikler mikrokürelerin yapısında bulunan yüksek molekül ağırlıklı PCL'ye ait T_M değerlerine ait olup, BF8 fomülasyon kodlu boş mikrokürenin erime sıcaklığı 55,97 °C olarak ölçülürken, VA yüklü F8 formülasyonunun erime sıcaklığı 56,85 °C olarak ölçülmüştür. Çekilen DSC termogramları incelendiğinde, boş ve VA yüklü mikrokürelerin termogramlarının hemen hemen birbirleri ile örtüştüğü görülmektedir. Etkin madde yüklenmiş mikrokürelerde VA'ya ilişkin termogram ortadan kaybolmuştur. Bu durumun, etkin maddenin mikroküre yapısı tarafından enkapsüle edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.16. Saf VA, boş F8 mikroküresi ve F8 mikroküresinin DSC termogramı

4.3.1.6. Mikrokürelerden *In Vitro* Vankomisin HCl Salım Deneyleri

Bölüm 3.2.3.3.6.1.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Salım deneylerine, mikrokürelerden salınan VA, salım örneklerinden HPLC ile analiz sonucu saptanamaz düzeye gelene kadar devam edilmiştir.

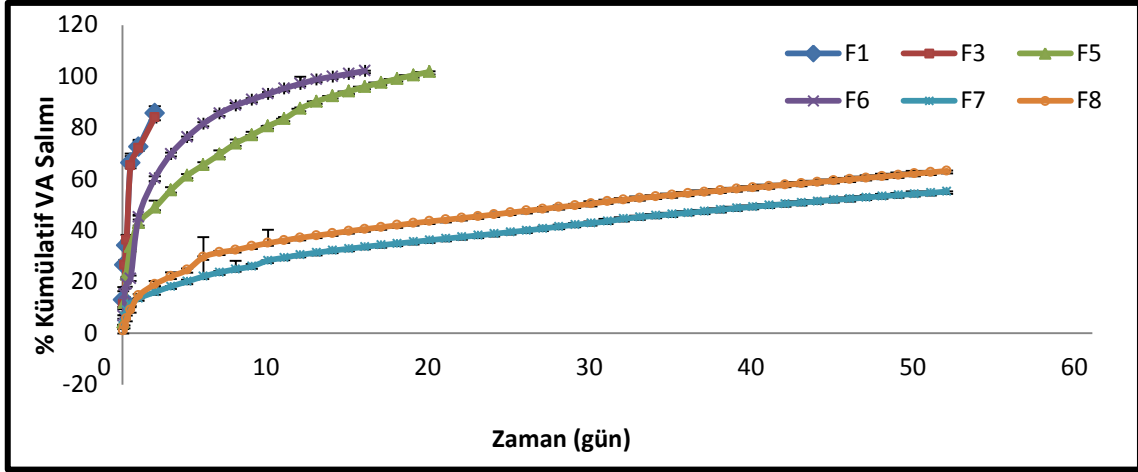
Düşük molekül ağırlıklı PCL polimeri (M_n 10.000) ile hazırlanan mikrokürelere yüklenen VA'nın, tamamına yakını bir gün içerisinde salınırken, orta molekül ağırlıklı (M_n 60.000) polimerler ile hazırlanan mikrokürelerden ise VA salımı 18 gün boyunca devam etmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı PCL polimeri (M_n 70.000-90.000) ile hazırlanan mikrokürelerden VA salımı 50 gün boyunca devam

etmiştir.

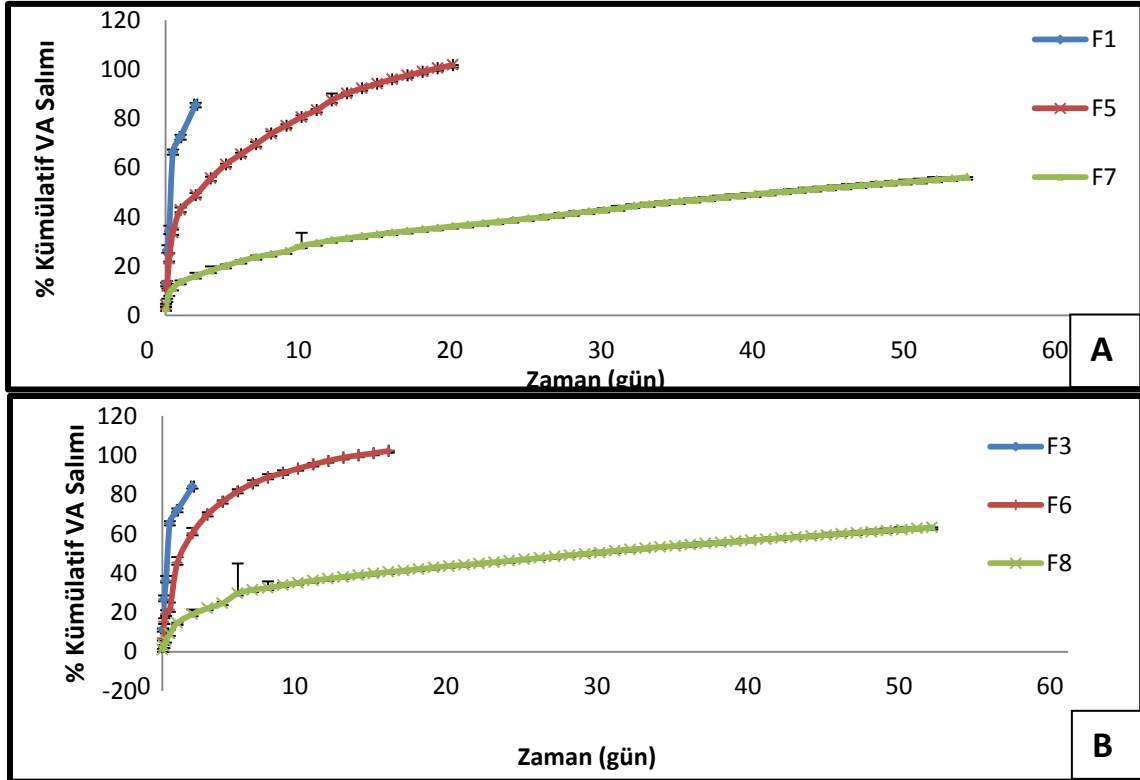
Mikrokürelerden etkin madde salımının hangi kinetik modele göre gerçekleştiğinin tayini için 0. Derece, Higuchi ve Hixon-Crowell modelleri uygulanmış ve mikroküre formülasyonları için en büyük R^2 değeri Higuchi kinetiğinden elde edilmiştir. Mikrokürelerden etkin madde salımının uyduğu Higuchi kinetiği matriksten ilaç salımını öngören bir kinetiktir (45) .

Tablo 4.7. Mikroküre formülasyonlarının salım kinetiklerinin değerlendirilmesine ilişkin veriler

Formülasyon	Uygulanan Kinetik Model								
	Higuchi			0. Derece			Hixon-Crowell		
	m	n	R^2	m	n	R^2	m	n	R^2
F1	12,60	6,62	0,90	1,42	27,27	0,76	0,04	0,44	0,86
F3	12,38	6,92	0,90	1,39	27,36	0,75	0,03	0,45	0,85
F5	4,531	12,90	0,97	0,19	31,72	0,86	0,01	0,40	0,98
F6	5,65	10,96	0,94	0,27	31,77	0,80	0,01	0,41	0,97
F7	1,41	6,01	0,99	0,03	17,49	0,92	0,001	0,27	0,92
F8	1,64	7,38	0,97	0,04	20,94	0,86	0,00,	0,33	0,92



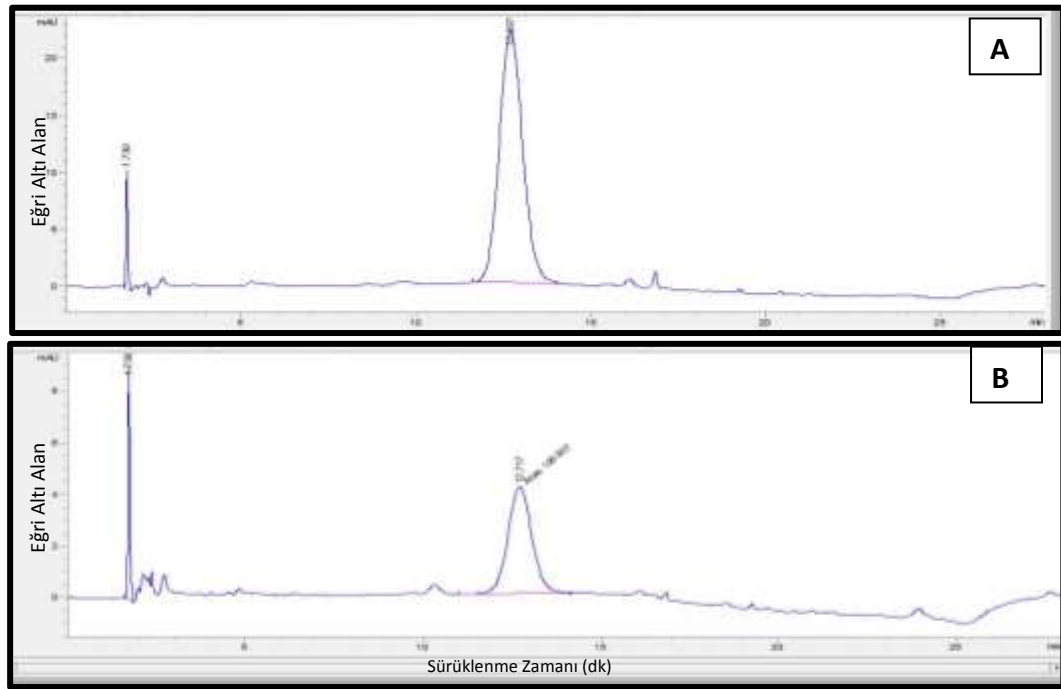
Şekil 4.17. Farklı molekül ağırlığına sahip PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerden zamana karşı vankomisin HCl salım profilleri (n=6) (F1: %0,05 PVA-14000 PCL, F3:%0,1 PVA-14000 PCL, F5: %0,05 PVA-65000 PCL, F6: %0,1 PVA-65000 PCL, F7: %0,05 PVA-80000 PCL, F8: %0,1 PVA-80000 PCL.)



Şekil 4.18. Farklı molekül ağırlığına sahip PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerden zamana karşı vankomisin HCl salım profilleri (n=6) **A:** İç fazında %0,05 PVA içeren mikroküre formülasyonları **B:** İç fazında %0,1 PVA içeren mikroküre formülasyonları (Formülasyon kısaltmaları için bkz.Tablo 3.4.)

4.3.1.6.1. *In Vitro* Salım Deneşleri Sonrasında Antibiyotiğin Kimyasal Stabilitesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.3.6.2.'de anlatıldığı gibi, hazırlama yöntemlerinin ve enkapsülasyon işleminin hazırlanan jel formülasyonlarından salınan vankomisin HCl'ün kimyasal stabilitesi üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla elde edilen salım numuneleri üzerinde kalitatif ve kantitatif olarak HPLC analizi yapılmıştır. Salım numunelerinden elde edilen HPLC kromatogramları ve pik alanları saf maddeye ait kromatogramlar ve pik alanları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kromatogramlar pik zamanları açısından değerlendirildiğinde salım sonrası elde edilen piklerin Vankomisin HCl'ün saf olarak uygulandığı pik zamanları ile aynı zamanda geldiği ve herhangi bir bozunma piki gelmediği görülmüştür.



Şekil 4.19. Saf VA (A) ve mikrokürelerden salınan VA'ya ait (B) HPLC pikleri

4.3.2. Steril PCL Mikrokürelerin Hazırlanması

4.3.2.1. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Sterilite Kontrolü

Bölüm 3.2.3.4.1.'de anlatıldığı şekilde gama radyasyon yöntemi ile sterilize edilen mikroküre formülasyonlarının sterilite kontrolleri Bölüm 3.2.3.4.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. USP 36'ya göre gama radyasyon ile sterilize edilen örneklerde on dört günlük inkübasyon süresi sonunda gözle görünür bir bulanıklık tespit edilmemiştir. Dolayısıyla sterilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği doğrulanmıştır.

4.3.2.2. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerde *in vitro* Karakterizasyon Çalışmaları

2,5 Mrad dozda gama radyasyon ile sterilizasyonun PCL polimerlerinde neden olabileceği zincir geveşemelerinin mikroküre salımına olası olumsuz etkilerinin araştırılması amacı ile sterilizasyon sonrası mikroküreler üzerinde *in vitro* karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

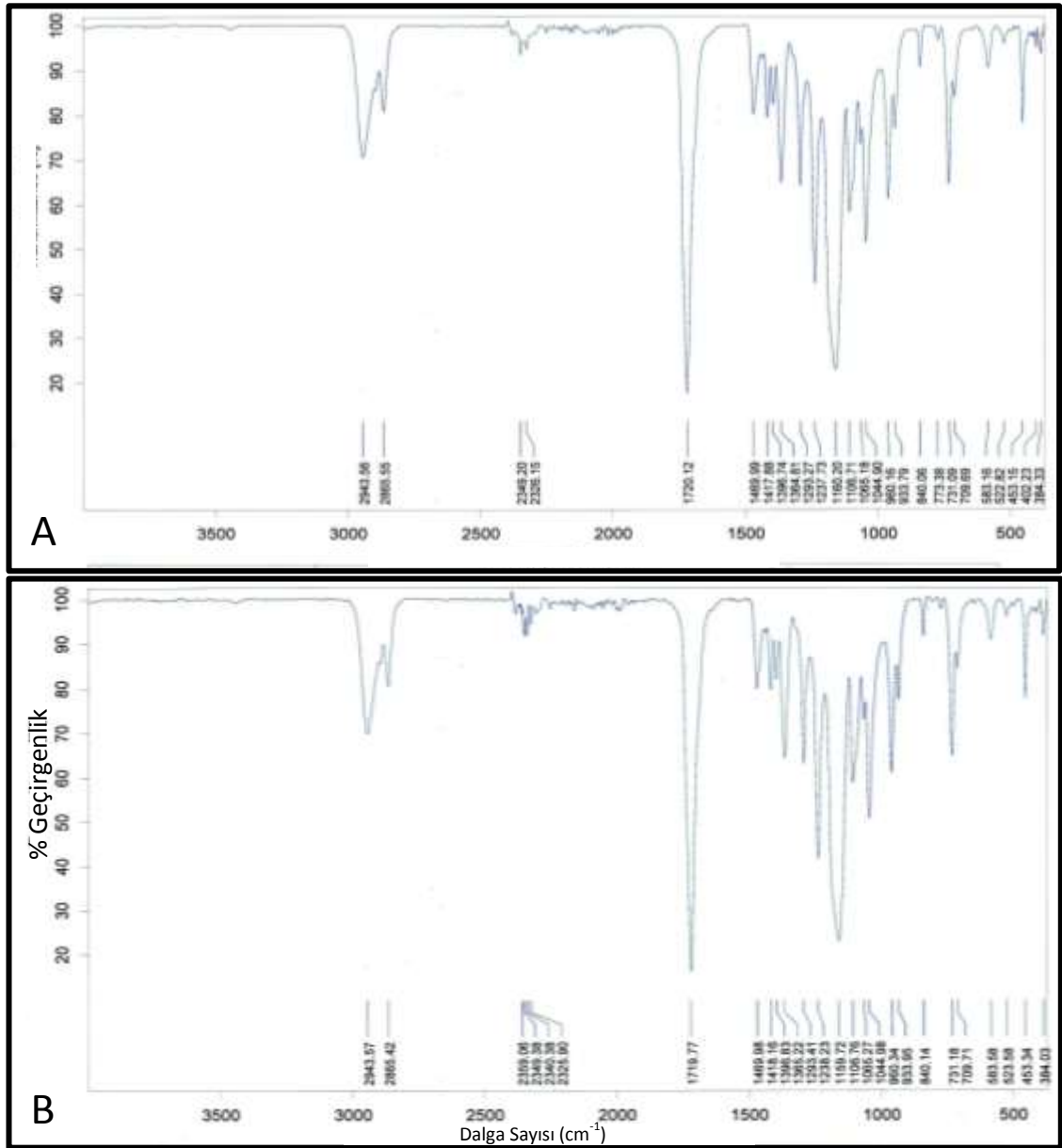
4.3.2.3. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.4.3.1.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen gama radyasyon ile sterilizasyonun mikrokürelerin yapısal özellikleri üzerine olası olumsuz etkilerini değerlendirmek amacı ile FTIR ve DSC analizleri yapılmıştır.

4.3.2.3.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.4.3.1.1.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon öncesi F8 formülasyon kodlu mikrokürelerin FT-IR spektrumları ile sterilizasyon

sonrası FT-IR spektrumları incelendiğinde, spektrumlar arası bir fark görülmektedir.

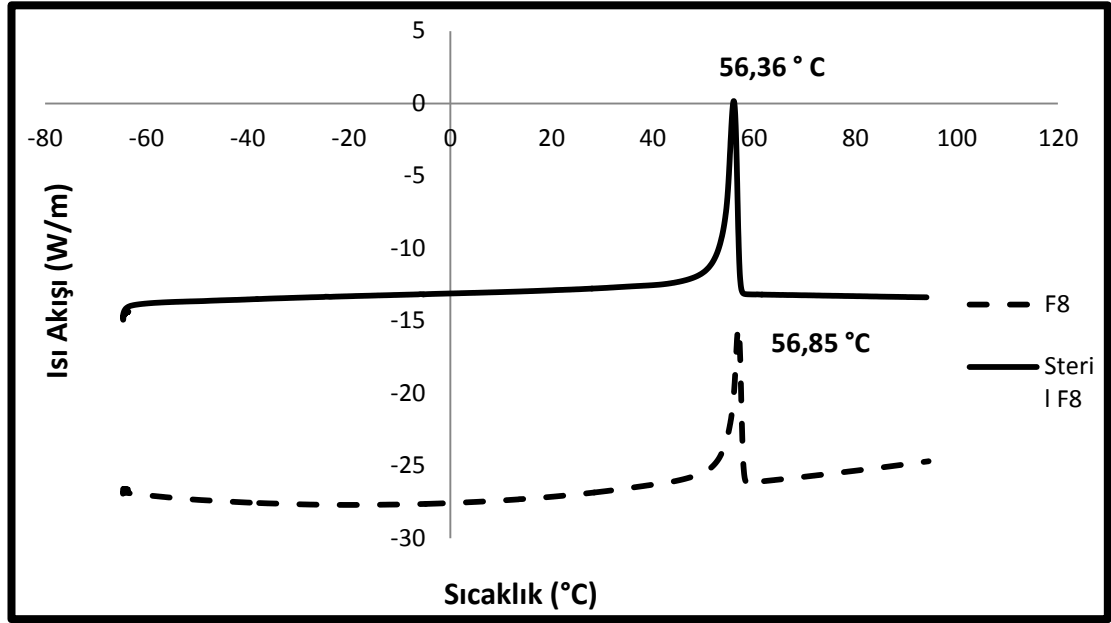


Şekil 4.20. Yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin **A:** sterilizasyon öncesi, **B:** sterilizasyon sonrası FTIR spektrumları

4.3.2.3.2. DSC Analizi

Bölüm 3.2.3.4.3.1.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon öncesi yüksek molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan F8 formülasyon kodlu

VA yüklü mikrokürenin erime derecesi 56,36 °C olarak ölçülürken, sterilizasyon sonrası 56,85 °C olarak bulunmuştur.



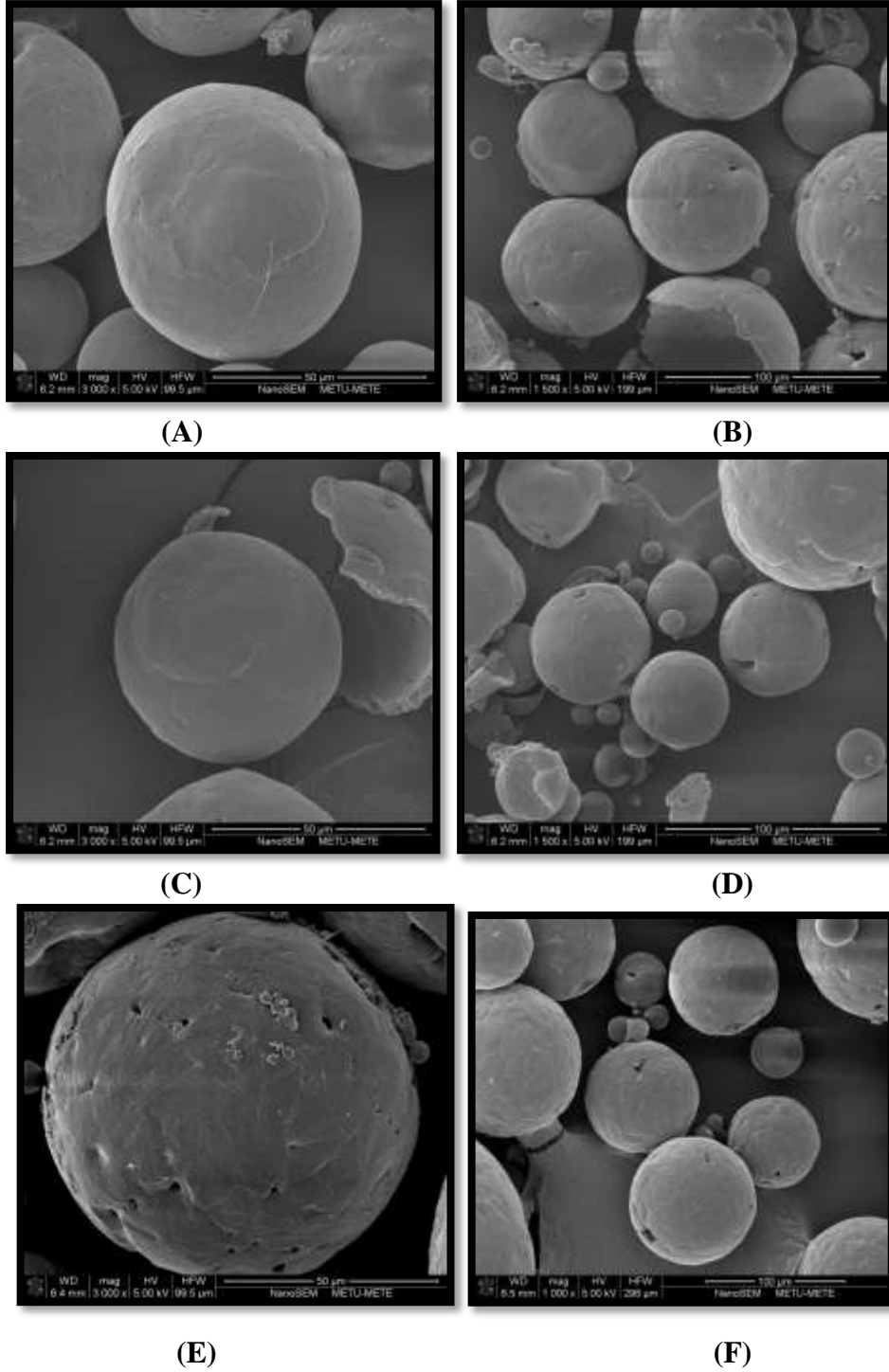
Şekil 4.21. F8 formülasyon kodlu mikroküreye ait sterilizasyon öncesi ve sonrası DSC termogramları

4.3.2.3.3. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Yüzey Özellikleri

Boş ve etkin madde yüklü mikrokürelerin yüzey özellikleri, Bölüm 3.2.3.4.3.2.'de anlatıldığı şekilde SEM kullanılarak incelenmiştir.

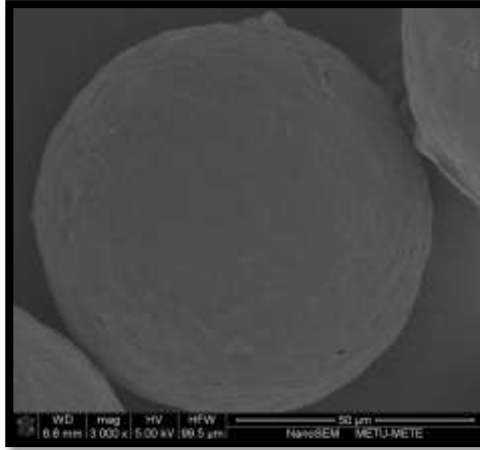
SEM fotoğrafları incelendiğinde, düşük (Mn 10.000), orta (Mn 60.000) ve yüksek (Mn 70.000-90.000) molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin küresele yakın şekilde partiküller olduğu belirlenmiştir.

VA Yüklü Steril Mikrokürelerin SEM Görüntüleri

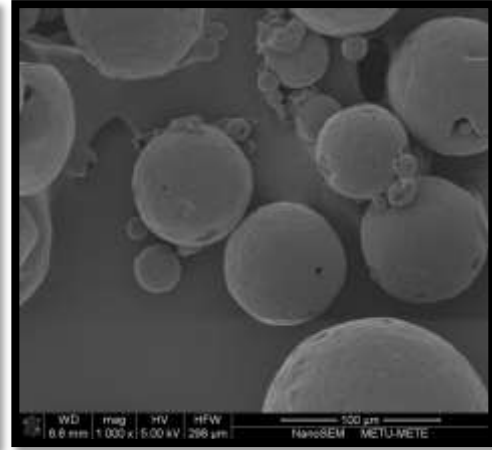


Şekil 4.22. Hazırlanan mikroküre formülasyonlarının sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri (**A,B:** F1 formülasyonu, **C,D:** F3 formülasyonu, **E,F:** F5 formülasyonu)

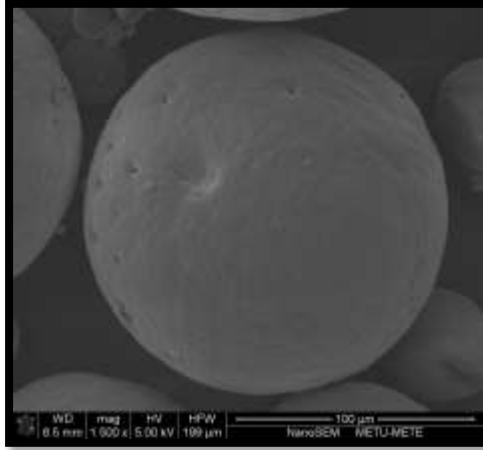
VA Yüklü Steril Mikrokürelerin SEM Görüntüleri



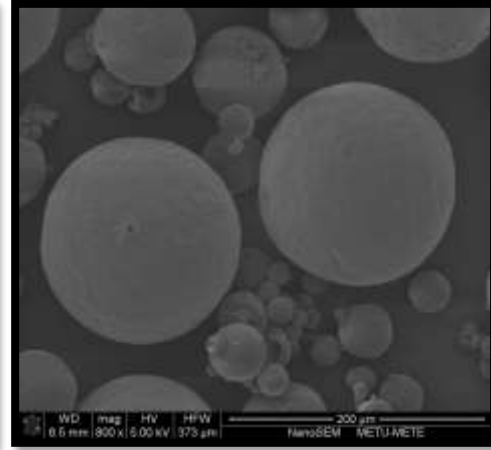
(G)



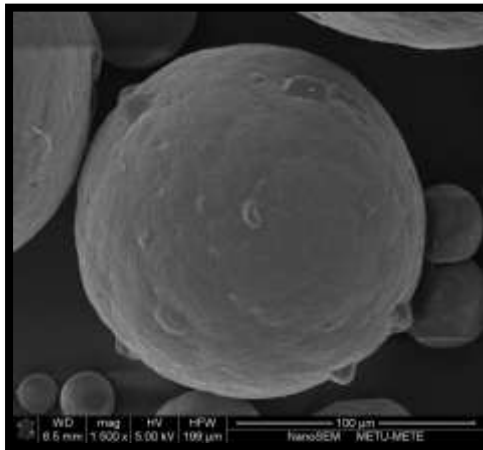
(H)



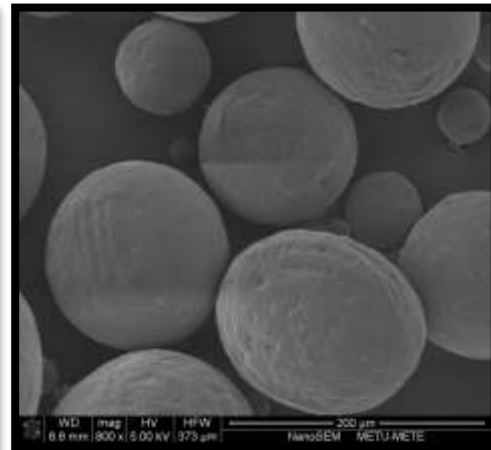
(I)



(J)

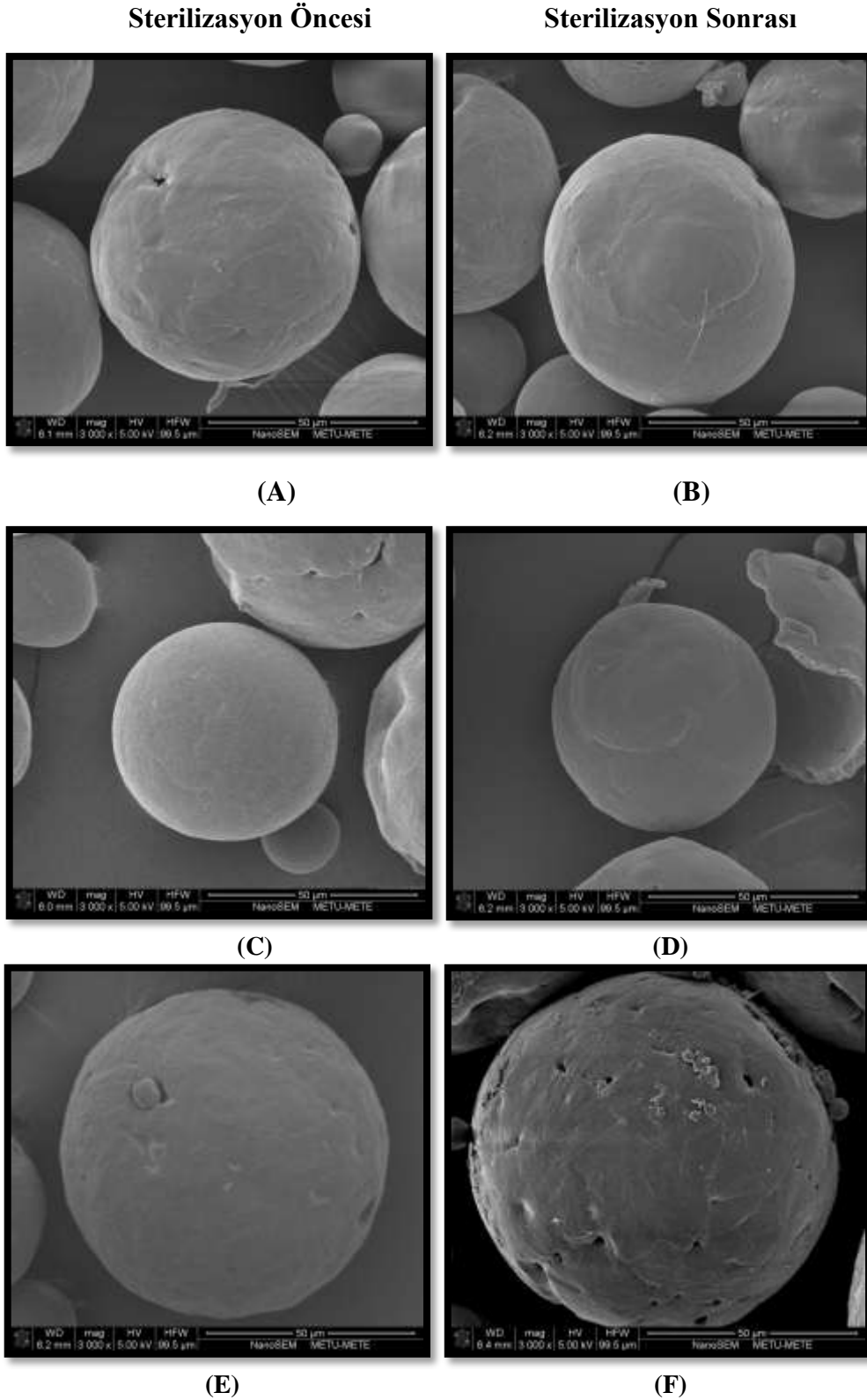


(K)

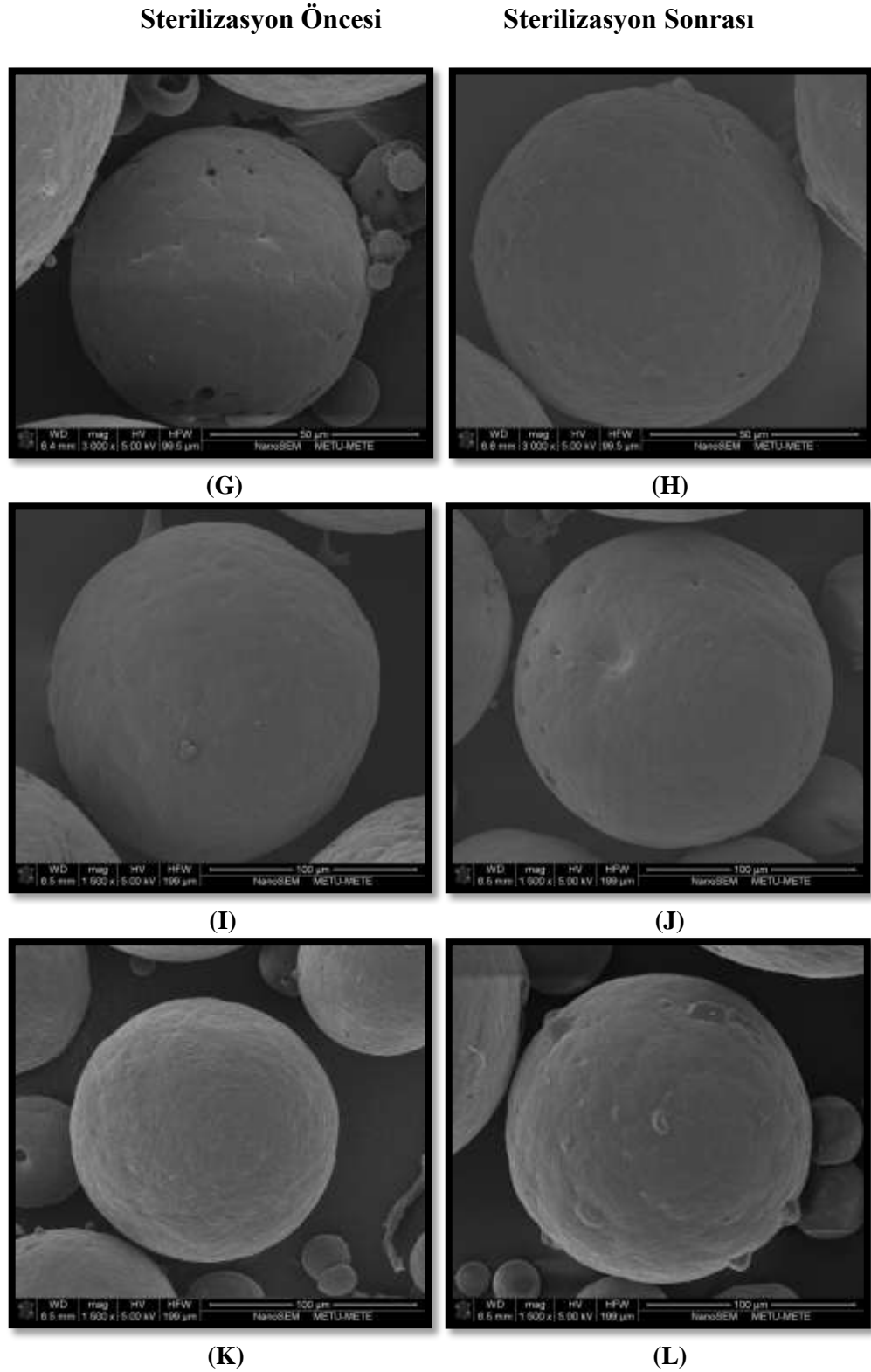


(L)

Şekil 4.23. Hazırlanan mikroküre formülasyonlarının sterilizasyon sonrası SEM görüntüleri (G,H: F6 formülasyonu, I,J: F7 formülasyonu, K,L: F8 formülasyonu)



Şekil 4.24. Hazırlanan mikroküre formülasyonlarının sterilizasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (**A:** F1 formülasyonu, **B:** Sterilizasyon sonrası F1 formülasyonu, **C:** F3 formülasyonu, **D:** Sterilizasyon sonrası F3 formülasyonu, **E:** F5 formülasyonu, **F:** Sterilizasyon sonrası F5 formülasyonu,)



Şekil 4.25. Hazırlanan mikroküre formülasyonlarının sterilizasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri (**G:** F6 formülasyonu, **H:** Sterilizasyon sonrası F6 formülasyonu **I:** F7 formülasyonu, **J:** Sterilizasyon sonrası F7 formülasyonu, **K:** F8 formülasyonu, **L:** Sterilizasyon sonrası F8 formülasyonu)

4.3.2.3.3.1. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Partikül Büyüklüğünün Tayini

Steril PCL mikrokürelerin partikül büyüklüğü ölçümü Bölüm 3.2.3.4.3.3.'te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklüğü, düşük molekül ağırlıklı PCL Mw 14000 polimeri ile hazırlanan formülasyonlarda, 61 µm civarında orta molekül ağırlıklı PCL Mn 60000 polimeri ile hazırlanan mikrokürelerde yaklaşık olarak 76 µm ve yüksek molekül ağırlıklı PCL Mn 70000-80000 ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarında ortalama 125 µm olarak ölçülmüştür.

Tez çalışmalarımız kapsamında hazırlanan mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklükleri incelendiğinde (Tablo 4.8.), tüm formülasyonların partikül büyüklüklerinin 60-134 µm aralığında bulunduğu saptanmıştır.

Tablo 4.8. Sterilizasyon sonrası farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan, farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin partikül büyüklüğü değerleri (n=3)

PCL MA / İç faz PVA oranı (%)	Polimer/ VA (a/a) (mg)	Sterilizasyon Sonrası Partikül Büyüklüğü (µm) X ± SS	Sterilizasyon Öncesi Partikül Büyüklüğü (µm) X ± SS	İstatistikî Karşılaştırma
F1	600 / 60	61,67 ± 0,12	58,05 ± 0,09	p>0,05
F1B	600/0	60,16 ± 0,16	54,48 ± 0,13	p>0,05
F3	600 / 60	62,23 ± 0,13	58,08 ± 0,10	p>0,05
F3B	600/0	63,29 ± 0,21	64,57 ± 0,17	p>0,05
F5	600 / 60	77,71 ± 0,57	71,84 ± 0,62	p>0,05
F5B	600/0	79,52 ± 0,35	81,49 ± 0,48	p>0,05
F6	600 / 60	74,99 ± 1,47	76,36 ± 1,93	p>0,05
F6B	600/0	74,48 ± 1,87	71,51 ± 0,87	p>0,05
F7	600 / 60	130,26 ± 1,86	134,12 ± 1,98	p>0,05
F7B	600/0	130,16 ± 1,36	130,16 ± 1,56	p>0,05
F8	600 / 60	119,35 ± 1,32	120,15 ± 1,43	p>0,05
F8B	600/0	117,92 ± 1,14	118,69 ± 1,81	p>0,05

4.3.2.3.3.2. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerde Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Tayini

Bölüm 3.2.3.4.3.4.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.9'da görüldüğü gibi, mikroküre formülasyonlarında kullanılan PCL polimerinin molekül ağırlığının artışı ile iç faza yüklenen VA miktarının da istatistiksel olarak anlamlı miktrada arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Bu artışın nedeninin, PCL polimerinin molekül ağırlığındaki artış ile artan partikül büyüklüğüne bağlı olduğu düşünülebilir. İç faz PVA oranlarındaki artışın da, aynı polimer ağırlığına sahip PCL polimerleri ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerinde bir artışa neden olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür .

Tablo 4.9. Sterilizasyon sonrası farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerin yükleme etkinliği değerleri

Formülasyon Kodu	Yüzeydeki % VA	İç Fazdaki % VA	Sterilizasyon Öncesi Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Sterilizasyon Sonrası Enkapsülasyon Etkinliği (%)	İstatistiki Karşılaştırma
F1	0,17	0,36	4,7	4,4	$p>0,05$
F3	0,16	0,34	4,1	5,1	$p>0,05$
F5	1,22	2,73	40,6	39,5	$p>0,05$
F6	1,16	3,41	47,1	45,7	$p>0,05$
F7	0,75	4,89	54,8	54,1	$p>0,05$
F8	0,78	4,46	58,4	52,1	$p>0,05$

4.3.2.3.3.3. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerden *İn Vitro* Salım Deneyleri

İn vitro salım çalışmaları “Diyaliz Torbası Yöntemi” kullanılarak Bölüm 3.2.3.4.3.5.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Salım deneylerine,

mikrokürelere salınan VA, salım örneklerinden HPLC ile analiz sonucu saptanamaz düzeye gelene kadar devam edilmiştir.

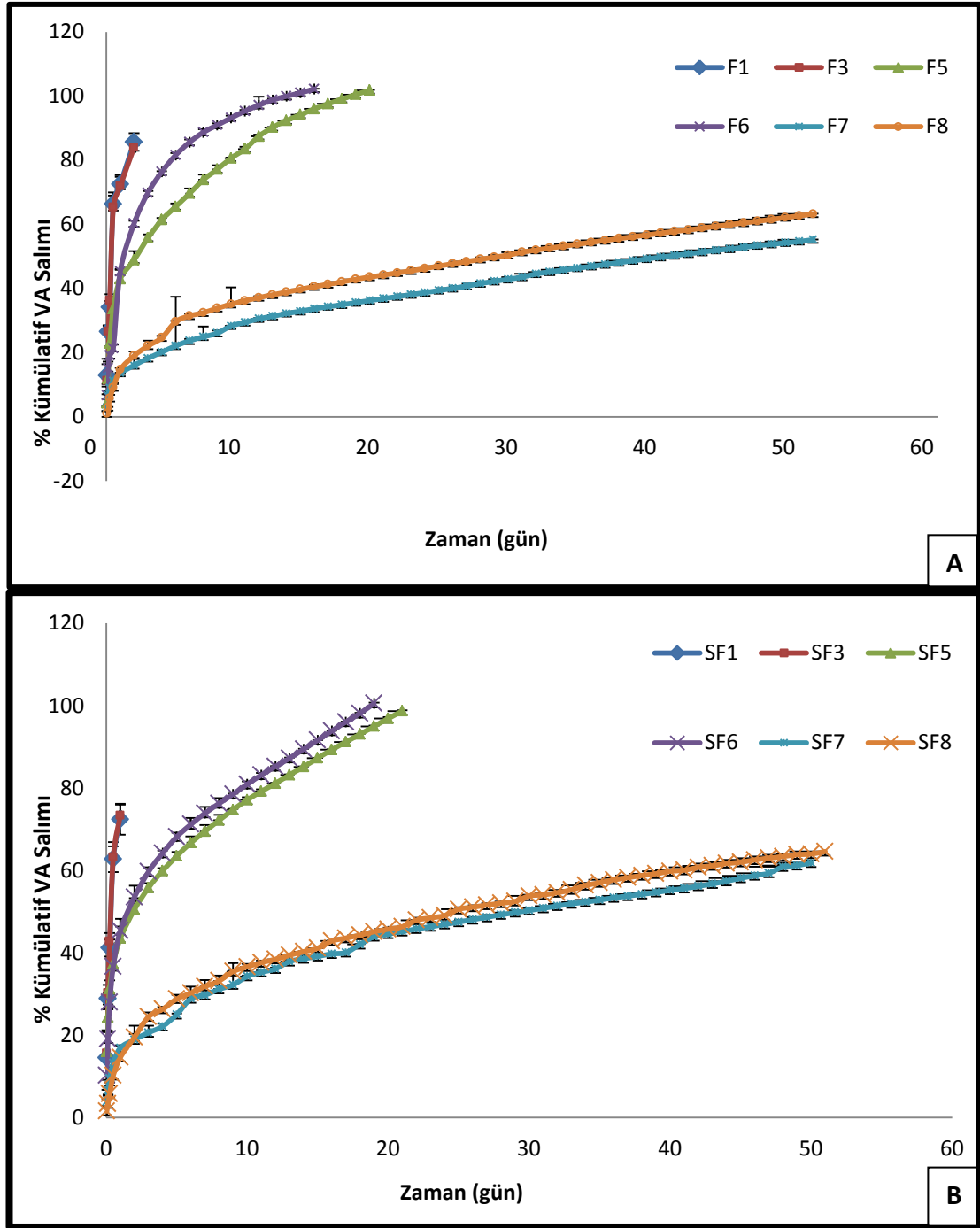
Düşük molekül ağırlıklı (Mw 14000) PCL polimeri ile hazırlanan mikrokürelere yüklenen VA'nın, tamamına yakını bir gün içerisinde salınırken, orta molekül (Mn 60.000) ağırlıklı polimerler ile hazırlanan mikrokürelere ise VA salımı 20 gün boyunca devam etmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı (Mn 70.000-90.000) PCL polimeri ile hazırlanan mikrokürelere ise VA salımı 50 gün boyunca devam etmiştir.

Düşük molekül ağırlıklı PCL ve iç fazında %0,05 oranında PVA içeren mikrokürelere 12. saat sonunda mikrokürelere yüklenmiş olan VA'nın %62,7'si, 24. saat sonunda ise %72,3'ü salınmıştır. İç fazında %0,1 oranında PVA içeren aynı molekül ağırlıklı mikrokürelere ise, benzer olarak 12. saat sonunda VA'nın %63,1'i, 24. Saat sonunda ise %73,3'ü salınmıştır.

Orta molekül ağırlıklı PCL mikrokürelere ise, 2. gün sonunda iç fazında %0,05 oranında PVA içeren formülasyona yüklenen VA'nın %50,5'inin, iç fazında %0,1 oranında PVA içeren formülasyona yüklenen VA'nın ise %53,5'inin salındığı görülmüştür. 20. gün sonunda ise iç fazında %0,1 oranında PVA içeren mikrokürelere VA'nın %100'ü, iç fazında %0,05 PVA içeren mikrokürelere ise %96,8i salınmıştır.

Yüksek molekül ağırlıklı PCL mikrokürelere ise, 25. gün sonunda iç fazında %0,05 oranında PVA içeren formülasyona yüklenen VA'nın %44,5'inin, iç fazında %0,1 oranında PVA içeren formülasyona yüklenen VA'nın ise %45,8'inin salındığı görülmüştür. 50. gün sonunda ise iç fazında %0,1 oranında PVA içeren mikrokürelere VA'nın %64'ü, iç fazında %0,05 PVA içeren mikrokürelere ise %61,8i salınmıştır.

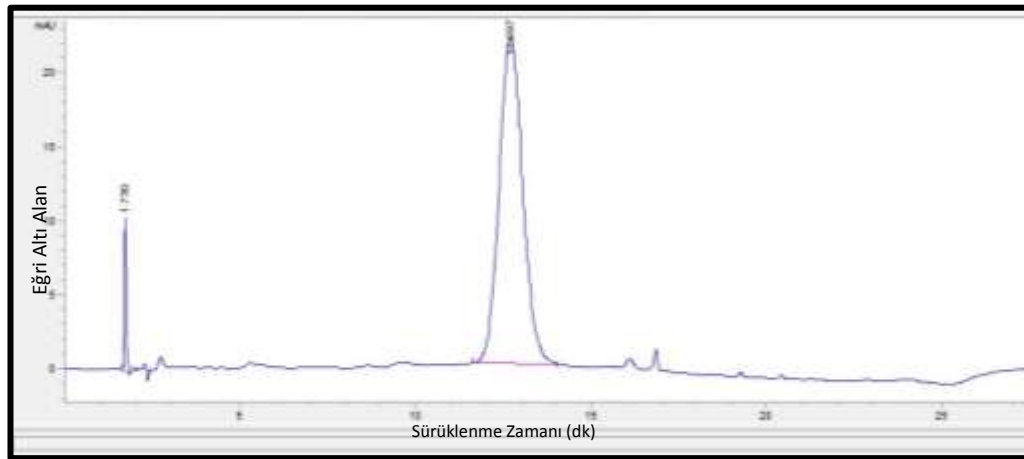
F1 ve F3 formülasyonları ile sterilizasyon sonrası SF1 ve SF3 formülasyonlarının salım profillerinin çok yakın olması nedeni ile salım grafiklerinde, F1 ve F3 profilleri ile SF1 ve SF3 profilleri çakışmıştır.



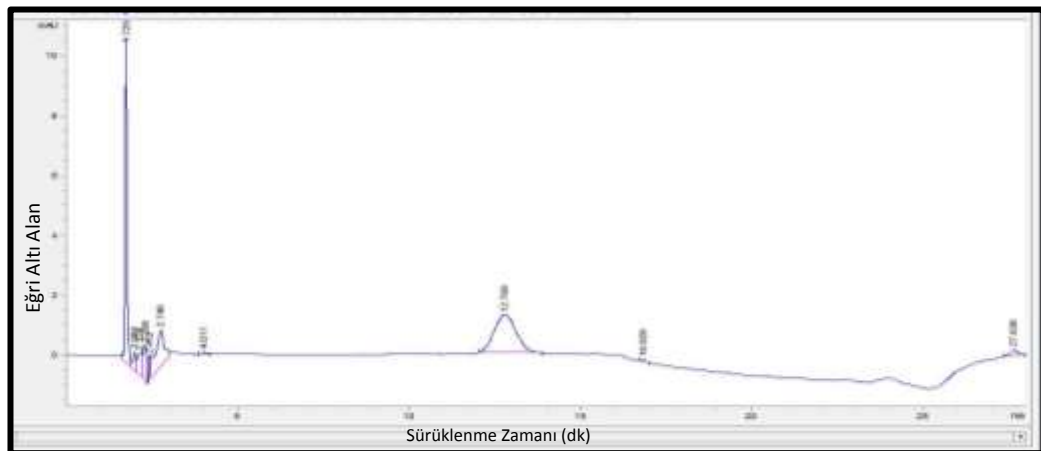
Şekil 4.26. A: Sterilizasyon öncesi, **B:** Sterilizasyon sonrası farklı MA'lı PCL polimerleri ile hazırlanan farklı iç faz PVA konsantrasyonlarındaki mikrokürelerden zamana karşı vankomisin HCl salımı profili (F1: %0,05 PVA-14000 PCL, F3:%0,1 PVA-14000 PCL, F5: %0,05 PVA-65000 PCL, F6: %0,1 PVA-65000 PCL, F7: %0,05 PVA-80000 PCL, F8: %0,1 PVA-80000 PCL) (SF1: Steril F1 PCL, SF3: Steril F3, SF5: Steril F5, SF6: Steril F6, SF7: Steril F7, SF8: Steril F8) (Formülasyon Kodları için bkz. Tablo 3.4.)

4.3.2.3.3.1. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinden Salınan Vankomisin HCL'ün Kimyasal Stabilitésinin İncelenmesi

Gama radyasyon ile sterilize edilen mikrokürelerde, sterilizasyonun hazırlanan mikroküre formülasyonlarından salınan vankomisin HCl'nin kimyasal stabilitesi üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla elde edilen salım numuneleri üzerinde Bölüm 3.2.3.4.3.6.'da anlatıldığı şekilde kalitatif ve kantitatif olarak HPLC analizi yapılmıştır. Salım numunelerinden elde edilen HPLC kromatogramları ve pik alanları saf maddeye ait kromatogramlar ve pik alanları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kromatogramlar Şekil 4.27. ve Şekil 4.28.'deki gibi elde edilmiştir. HPLC analizi sonucu salım numunelerindeki VA ile saf VA'nın sürüklenme zamanları arasında bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.27. Saf Vankomisin HCl'e ait pik



Şekil 4.28. Salım sonrası Vankomisin HCl'e ait pik

4.3.2.3.3.4. İlaç İçeren Termosensitif Hidrojellerin Hazırlanması ve İlaç Yüklü Jel Formülasyonları Üzerinde Sterilizasyon Öncesi ve Sonrası Karakterizasyon Çalışmaları

4.3.2.3.3.4.1. Jelleşme Sıcaklığının Tespiti ve Viskozitenin Değerlendirilmesi

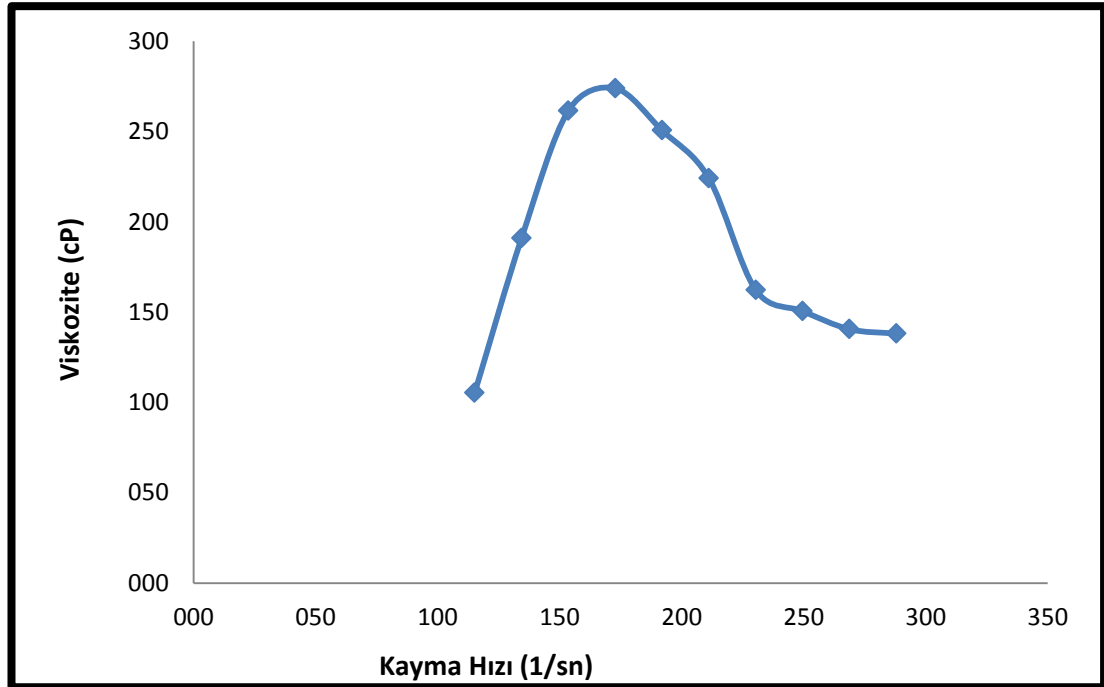
Hazırlanan termosensitif jellerin jelleşme sıcaklığının tespitine ilişkin çalışmalar Bölüm 3.2.3.5.2.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Steril olmayan pluronik jellerde sol-jel geçiş sıcaklığı 22°C, kitosan jellerde ise 41°C olarak tespit edilmiştir (n=3). Otoklav sterilizasyonu sonrası steril pluronik jellerin sol-jel geçiş sıcaklığı 21°C olarak bulunurken, steril kitosan jellerin sterilizasyon sonrası sol-jel geçiş özelliklerinde bozunma tespit edilmiştir.

Sol-jel geçiş sıcaklığının tespitinden sonra, jeller üzerinde 37 °C'de reolojik ölçümler yapılmıştır. Reolojik ölçümler, sterilizasyon öncesi boş kitosan ve pluronik jel ile sterilizasyon sonrası boş kitosan jel ile, boş, sadece serratopeptidaz içeren, sadece antibiyotik içeren ve serratopeptidaz-antibiyotik ve antibiyotik yüklü PCL mikrokürelerini içeren pluronik hidrojeller üzerinde yapılmıştır. Steril kitosan jel ölçümlerinde ise viskozitenin çok düşmesi nedeni ile anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

Jel formülasyonlarının, kayma hızına karşı viskozite değerlerinin grafikleri verilmiştir. pluronik ile hazırlanan jel formülasyonlarının grafikleri incelendiğinde (Şekil 4.30., 4.31., 4.32., 4.33.,4.34.) kayma hızı arttıkça viskozite değerlerinin azaldığı görülmektedir. Kayma hızı arttıkça viskozitenin azalması ve hesaplanan power index değerlerinin 1'den küçük olması nedenleri ile pluronik jel formülasyonlarının akış tipinin psödoplastik akış olduğu belirlenmiştir. Kitosan jel formülasyonuna ait kayma hızına karşı viskozite grafiği (Şekil 4.29.) incelendiğinde ise, başlangıçta viskozitenin kayma hızındaki artış ile arttığı, ancak kayma hızı 192 s⁻¹ değerine ulaştıktan sonra kayma hızındaki artış ile viskozitenin azaldığı görülmektedir. Reometre cihazının verdiği değerler incelendiğinde, power indeks değeri 1'den küçük çıkmış ve %73,3 güven aralığında power law'a uyduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, kitosan jelin akış tipinin de psödoplastik akış olduğu belirlenmiştir.

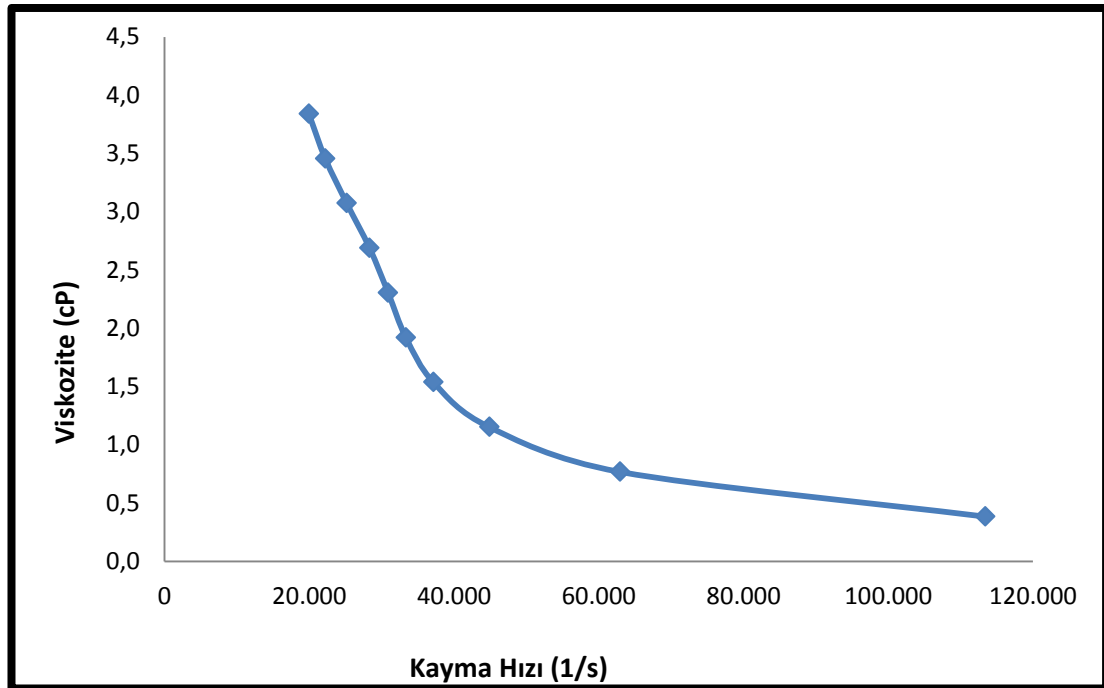
Tablo 4.10. Sterilizasyon öncesi kitosan jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)

Dönüş Hızı (rpm)	Viskozite (cP)	Kayma Gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma Hızı (1/s)
30,00	105,33	121,34	115,20
35,00	190,92	256,60	134,40
40,00	261,59	401,80	153,60
45,00	273,96	473,41	172,80
50,00	250,71	481,37	192,00
55,00	224,15	473,41	211,20
60,00	162,31	373,95	230,40
65,00	150,62	375,94	249,60
70,00	140,60	377,93	268,80
75,00	138,13	397,82	288,00

**Şekil 4.29.** Sterilizasyon öncesi termosensitif kitosan jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği

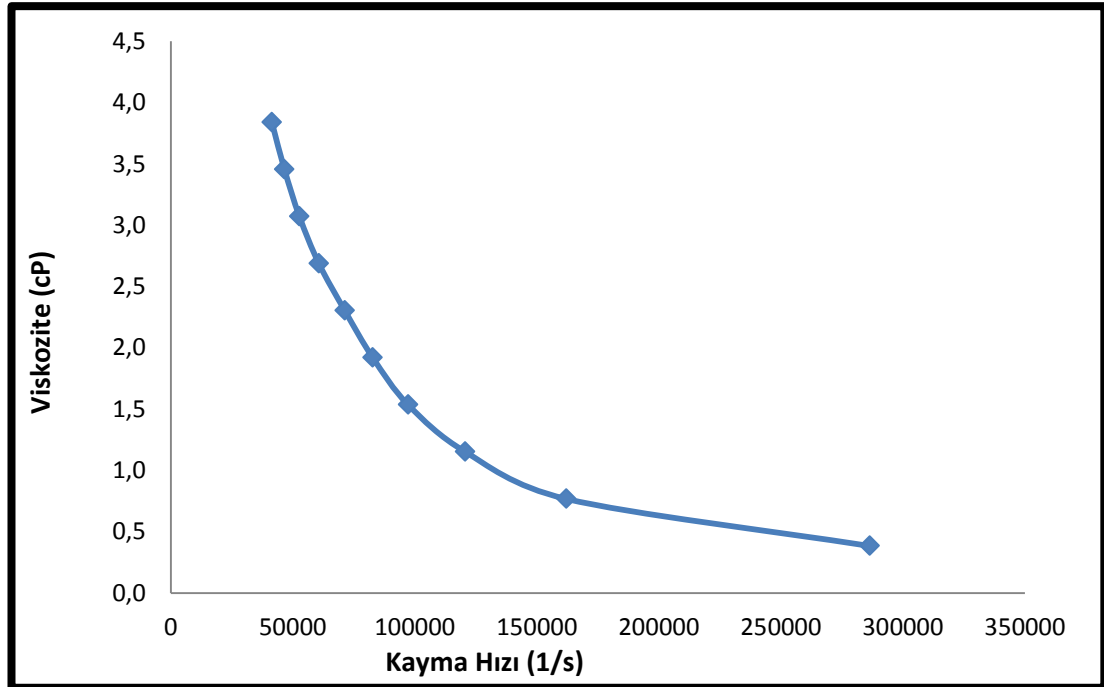
Tablo 4.11. Sterilizasyon öncesi pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)

Dönüş Hızı (rpm)	Viskozite (cP)	Kayma Gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma Hızı (1/s)
0,10	113.442,00	435,62	0,38
0,20	62.937,00	483,36	0,77
0,30	44.893,33	517,17	1,15
0,40	37.166,50	570,88	1,54
0,50	33.359,20	640,50	1,92
0,60	30.907,33	712,10	2,30
0,70	28.342,00	761,83	2,69
0,80	25.187,75	773,77	3,07
0,90	22.216,44	767,80	3,46
1,00	19.943,00	765,81	3,84

**Şekil 4.30.** Sterilizasyon öncesi termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği

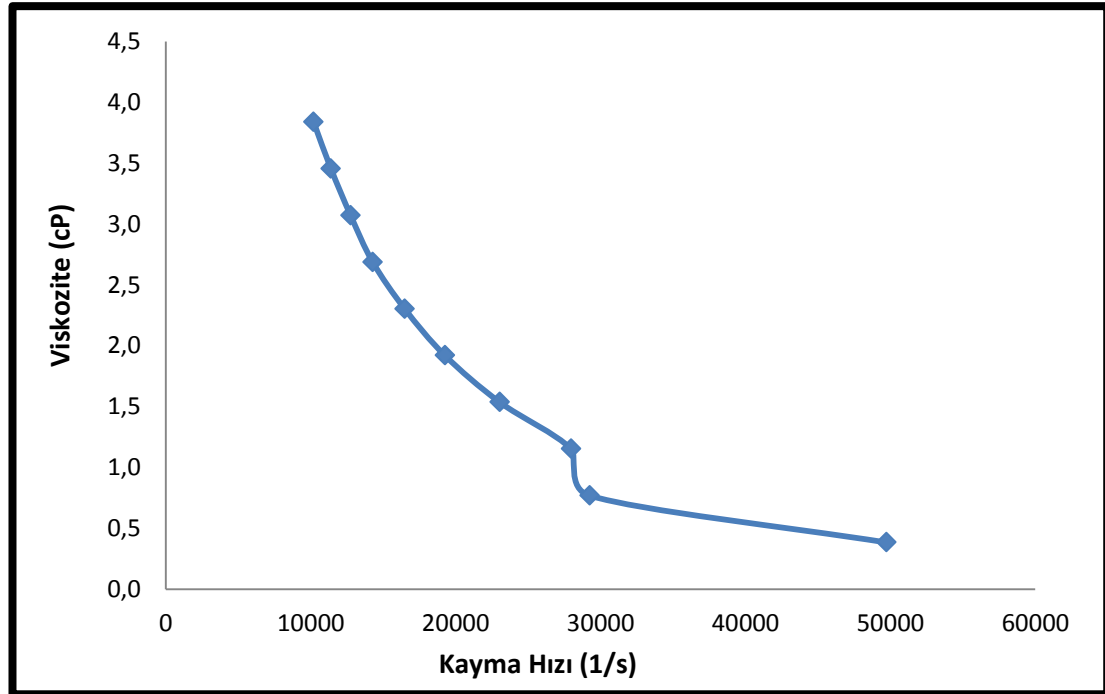
Tablo 4.12. Sterilizasyon sonrası pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)

Dönüş Hızı (rpm)	Viskozite (cP)	Kayma Gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma Hızı (1/s)
0,10	286454,00	1099,98	0,38
0,20	162134,00	1245,19	0,77
0,30	120694,00	1390,39	1,15
0,40	97254,50	1493,83	1,54
0,50	82776,40	1589,31	1,92
0,60	71311,33	1643,01	2,30
0,70	60680,00	1631,08	2,69
0,80	52706,50	1619,14	3,07
0,90	46562,44	1609,20	3,46
1,00	41440,00	1591,30	3,84

**Şekil 4.31.** Sterilizasyon sonrası termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği

Tablo 4.13 Sterilizasyon sonrası SP içeren pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)

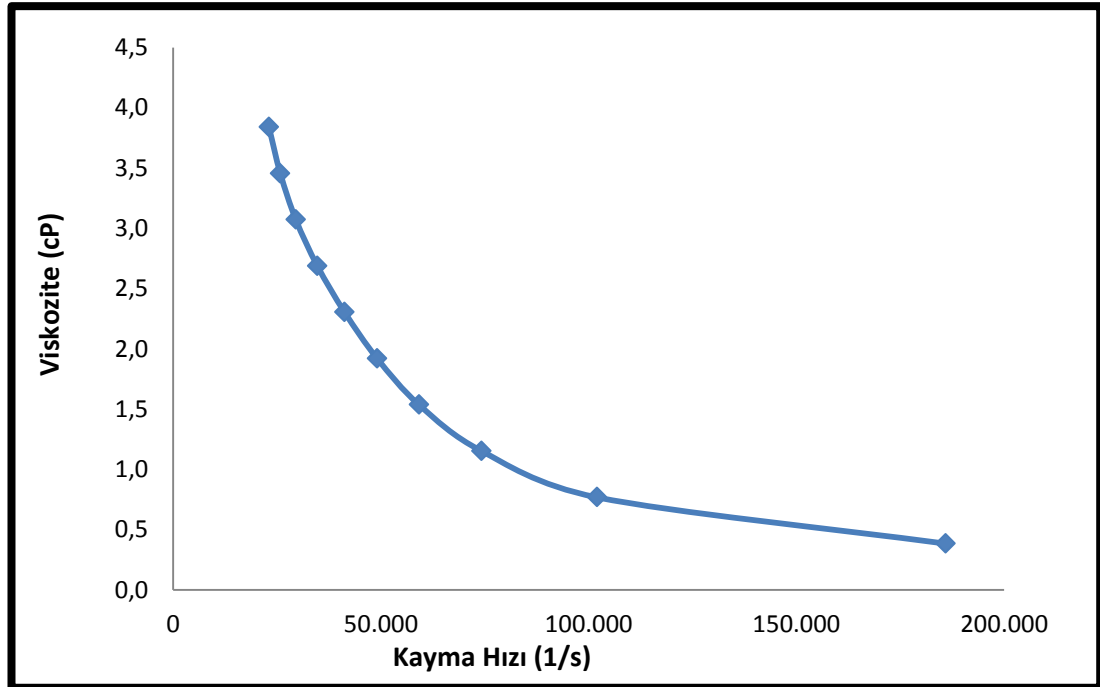
Dönüş Hızı (rpm)	Viskozite (cP)	Kayma Gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma Hızı (1/s)
0,10	49728,00	190,96	0,38
0,20	29267,00	224,77	0,77
0,30	27972,00	322,24	1,15
0,40	23051,00	354,06	1,54
0,50	19269,60	369,98	1,92
0,60	16489,67	379,92	2,30
0,70	14282,00	383,90	2,69
0,80	12755,75	391,86	3,07
0,90	11396,00	393,85	3,46
1,00	10204,60	391,86	3,84



Şekil 4.32. Sterilizasyon sonrası SP içeren termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği

Tablo 4.14. Sterilizasyon sonrası VA içeren pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)

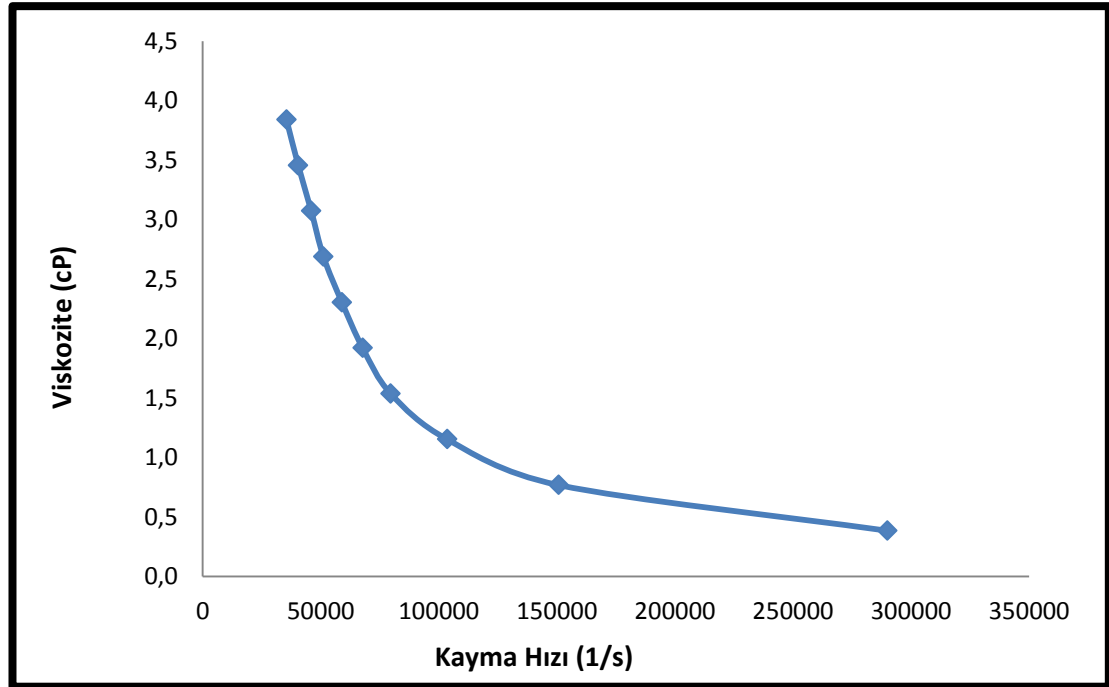
Dönüş Hızı (rpm)	Viskozite (cP)	Kayma Gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma Hızı (1/s)
0,10	185.962,00	714,09	0,38
0,20	102.046,00	783,71	0,77
0,30	74.246,67	855,32	1,15
0,40	59.181,50	909,03	1,54
0,50	49.106,40	942,84	1,92
0,60	41.267,33	950,80	2,30
0,70	34.706,00	932,90	2,69
0,80	29.526,00	907,04	3,07
0,90	25.784,89	891,13	3,46
1,00	23.051,00	885,16	3,84



Şekil 4.33. Sterilizasyon sonrası VA içeren termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği

Tablo 4.15. Sterilizasyon sonrası VA, SP ve VA yüklü mikroküre içeren pluronik jelin reolojik ölçüm bulguları (n=3)

Dönüş Hızı (rpm)	Viskozite (cP)	Kayma Gerilimi (dyn/cm ²)	Kayma Hızı (1/s)
0,10	290080,00	1113,91	0,38
0,20	150738,00	1157,67	0,77
0,30	103600,00	1193,47	1,15
0,40	79642,50	1223,31	1,54
0,50	67754,40	1300,88	1,92
0,60	58965,67	1358,57	2,30
0,70	51134,00	1374,48	2,69
0,80	45972,50	1412,28	3,07
0,90	40461,56	1398,35	3,46
1,00	35483,00	1362,55	3,84



Şekil 4.34. Sterilizasyon sonrası VA, SP ve VA yüklü mikroküre içeren termosensitif pluronik jelin 37 °C'deki kayma hızına karşı kayma gerilimi grafiği

4.3.2.3.3.4.2. İlaç Yüklü Steril Jel Formülasyonundan *in vitro* Salım Deneyleri ve Validasyonu

In vitro salım çalışmaları “Diyaliz Torbası Yöntemi” kullanılarak Bölüm 3.2.3.5.2.’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Salım deneylerine, ilaç yüklü steril jel formülasyonlarından salınan VA, salım örneklerinden HPLC ile analiz sonucu saptanamaz düzeye gelene kadar devam edilmiştir.

Serbest VA ve SP ile VA yüklü mikroküre içeren steril sonuç formülasyonlarda, *in vivo* çalışmalar için optimum salımı sağlayacak formülasyonun tespit edilebilmesi için, kitosan veya pluronik jel içerisinde değişik miktarlarda serbest VA ve SP ile VA yüklü mikroküre içeren jel formülasyonları hazırlanmış ve *in vitro* salım profilleri elde edilmiştir. Bu amaçla ilk olarak, pluronik veya kitosan jellerden hangisi ile ileri formülasyon çalışmalarına devam edileceğinin tespiti yapılmıştır. Bunun için, kitosan ve pluronik jellerin aynı hacimleri içerisinde (0,5 mL jel), aynı miktarda VA (16 mg), SP (2,5 mg) ve VA yüklü mikroküre (iç fazında %0,1 oranında PVA içeren; 100 mg) içeren formülasyonları kullanılmış, elde edilen sonuçlar değerlendirilerek uygun jel tipine karar verilmiştir.

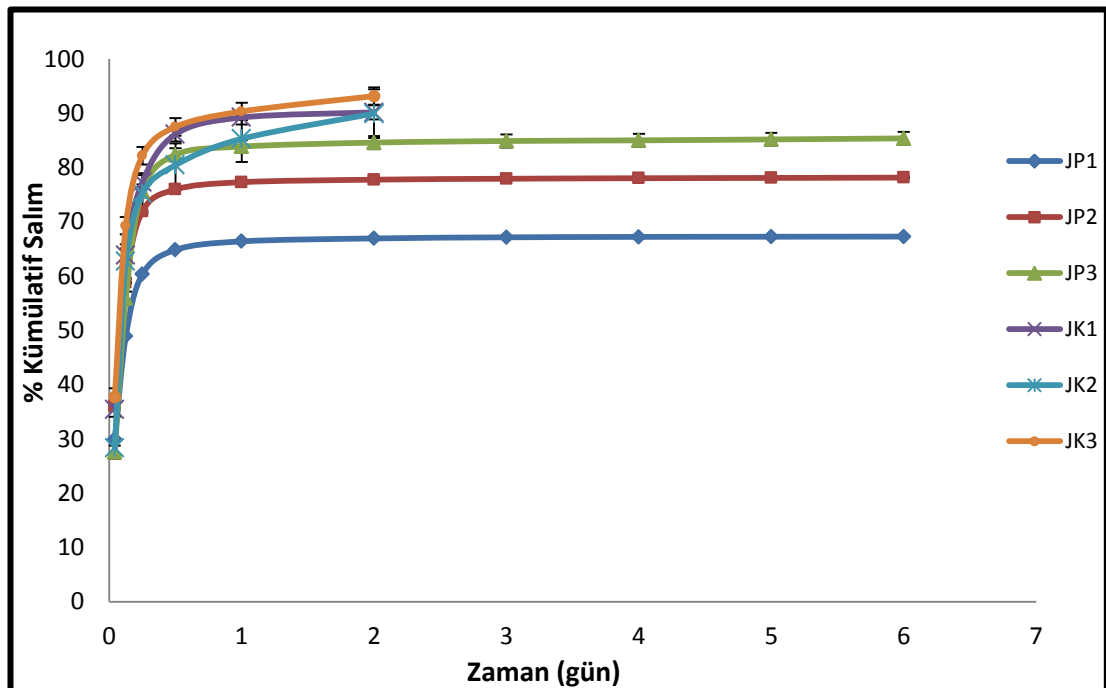
Kitosan formülasyonlarına bakıldığında, VA yüklü mikroküre olarak düşük molekül ağırlıklı polimerden hazırlanmış mikroküre içeren jel formülasyonunda (JK1), jeldeki total VA’nın % 63,7’si 3. saat sonunda salınırken, % 90,1’inin 48 saat sonra salındığı tespit edilmiştir. Orta molekül ağırlıklı polimerden hazırlanmış mikroküreleri içeren kitosan jel formülasyonunda (JK2) ise jeldeki total VA’nın % 62,6’sı 3. saat sonunda salınırken, ikinci gün sonunda % 89,9’u salınmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı polimerden hazırlanmış mikroküreleri içeren kitosan jel formülasyonunda (JK3) ise 3. saat sonunda jeldeki total VA’nın %69,2’si salınırken, ikinci gün sonunda % 93,1’i salınmıştır (Şekil 4.35.).

Pluronik formülasyonlarından salım bulguları incelendiğinde, VA yüklü düşük molekül ağırlıklı polimerden hazırlanmış mikroküre içeren jel formülasyonunda (JP1), jeldeki total VA’nın % 48,9’u 3. saat sonunda salınırken, 24’üncü saatte % 66,3’ü, altıncı gün sonunda % 67,2’si salınmıştır. Orta molekül ağırlıklı polimerden hazırlanmış mikroküreleri içeren pluronik jel formülasyonunda (JP2), 3. saat sonunda jeldeki total VA’nın %58,8’i salınırken, birinci gün sonunda %

77,3'ü, altıncı gün sonunda ise % 78,1'i salınmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı polimerden hazırlanmış mikroküre içeren pluronik jel formülasyonunda (JP3) ise 3. saat sonunda jeldeki total VA'nın % 75,7'si salınırken, birinci gün sonunda % 83,8'i, altıncı gün sonunda ise % 85,3'ü salınmıştır (Şekil 4.35.).

Tablo 4.16. Jel formülasyonlarından zamana karşı % Kümülatif VA salım değerleri

Zaman (gün)	% Kümülatif VA Salım Değerleri					
	JP1	JP2	JP3	JK1	JK2	JK3
0,0	29,9	36,1	27,6	35,4	28,3	37,7
0,1	48,9	58,8	55,9	63,8	62,7	69,3
0,3	60,3	71,9	75,7	77,3	75,2	82,2
0,5	64,8	75,9	82,3	86,1	80,4	87,5
1,0	66,4	77,3	83,8	89,2	85,3	90,3
2,0	66,9	77,7	84,6	90,1	89,9	93,1
3,0	67,1	77,9	84,9			
4,0	67,2	78,0	85,0			
5,0	67,2	78,1	85,2			
6,0	67,3	78,1	85,4			



Şekil 4.35. İlaç yüklü steril jel formülasyonlarından VA salımı

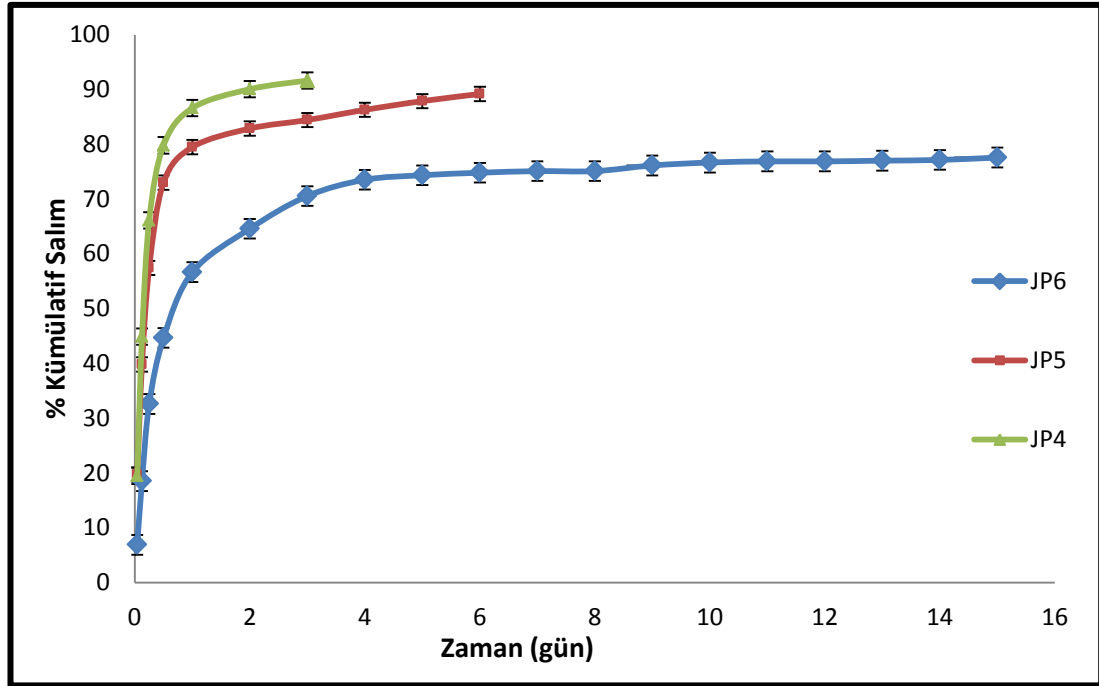
Ön denemeler sonucunda ilaç yüklü steril pluronik jelden VA salımının daha uzun süre ve daha stabil bir profil sergilediği görülmüş ve ileri çalışmalarına Pluronic jel bazlı formülasyonlar ile devam edilmiştir. PCL mikroküre formülasyonlarından elde edilen sonuçlara göre, daha yüksek VA enkapsülasyon etkinliği ve daha uzun süreli salım profili elde edilmesi nedeni ile PCL Mn 70000-90000 polimeri ile hazırlanan ve iç fazında %0,1 oranında PVA içeren mikroküre formülasyonları ile çalışmalara devam edilmiştir.

Optimum salım profilini bulmak üzere yapılan ileri formülasyon çalışmalarında, 0,5 mL steril pluronik jel içerisinde sabit miktarlarda VA (16 mg) ve SP (5 mg) ve değişen miktarlarda VA yüklü mikroküre içeren (formülasyonlarda VA miktarı: 500 mg – JP6, 300 mg – JP5, 250 mg – JP4) jel formülasyonları hazırlanmış ve salım çalışmaları yapılmıştır. Aynı formülasyonların SP içermeyenleri ile de, SP aktivitesinin gösterilmesi amacı ile salım çalışmaları yapılmıştır.

Bu çalışmalarda, birinci gün sonunda içerisinde yüksek molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan mikroküreleri içeren pluronik jel formülasyonundan 500 mg mikroküre içeren formülasyonda (JP6) birinci gün sonunda total VA'nın % 56,7'si salınırken, 300 mg mikroküre içeren jel formülasyondan (JP5) VA'nın % 79,5'i, 250 mg mikroküre içeren jel formülasyondan (JP4) ise VA'nın % 86,6'sı salınmıştır. JP6 formülasyonundan on beşinci gün sonunda total VA'nın % 77,6'sı salınırken, JP5 formülasyonundan altıncı gün sonunda VA'nın % 89,2'si, JP4 formülasyonundan altıncı gün sonunda VA'nın % 89,2'si üçüncü gün sonunda % 91,6'sı salınmıştır. Steril pluronik jel formülasyonlarından VA salım profilleri Şekil 4.36.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.17. Pluronik jel formülasyonlarından zamana karşı % Kümülatif VA salım değerleri

Zaman (gün)	% Kümülatif VA Salım Değerleri		
	JP6	JP5	JP4
0,04	6,9	19,5	19,7
0,13	18,6	44,9	39,9
0,25	32,6	66,1	57,5
0,50	44,7	79,8	73,0
1	56,7	86,6	79,5
2	64,6	90,1	82,9
3	70,6	91,6	84,4
4	73,5	92,3	85,2
5	74,4	92,5	85,6
6	74,8	92,7	85,8
7	75,1	92,7	86,0
8	75,1	92,8	86,1
9	76,2	92,8	86,1
10	76,7	92,8	86,2
11	76,9	92,9	86,2
12	76,9	92,9	86,2
13	77,0	92,9	86,2
14	77,2	92,9	86,3
15	77,3	92,9	86,3
16	77,4		86,3
17	77,5		86,3
18	77,6		86,3

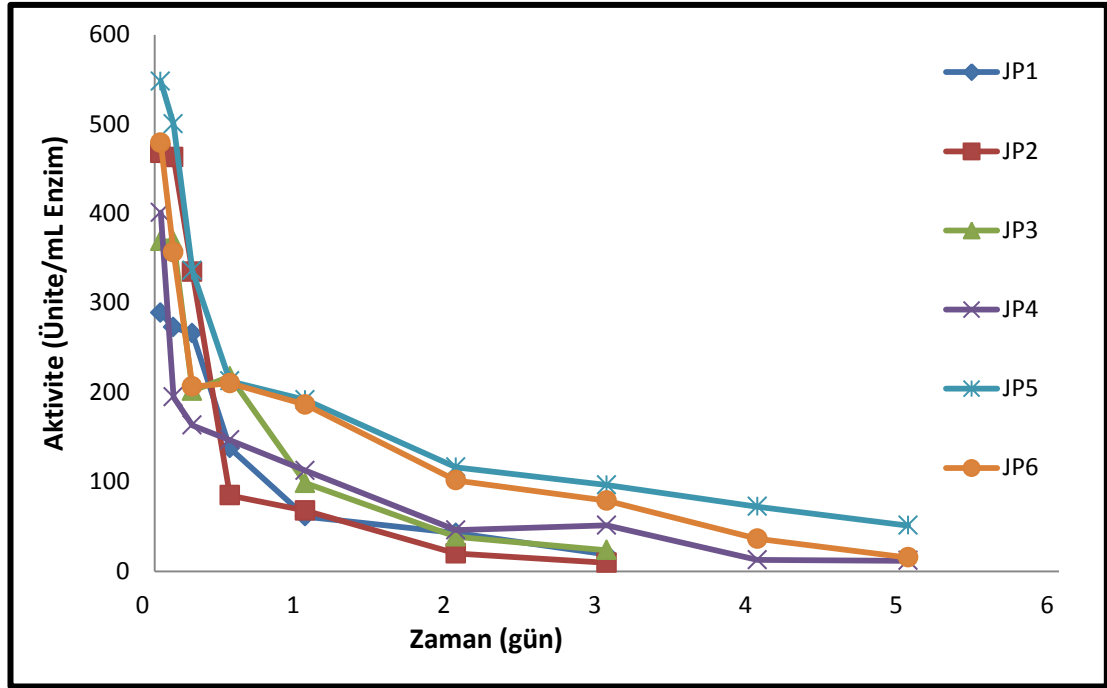


Şekil 4.36. İlaç yüklü steril pluronik jel formülasyonlarından VA salımı

4.3.2.3.3.4.3. *In Vitro* Salım Deneyleri Sonrasında Serratiopeptidazın Aktivitesinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.5.3.2.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Pluronic jel ve düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL mikroküreleri ile hazırlanan jel formülasyonlarından salım örnekleri ile yapılan SP aktivitesi deneylerinde, 2,5 mg total SP içeren JP1 formülasyonunda 2 gün, JP2 formülasyonunda 1 gün, JP3 formülasyonunda 2 gün; yüksek molekül ağırlıklı PCL mikroküreleri ile hazırlanan ve 5 mg total SP içeren JP4 formülasyonunda 4 gün, JP5 ve JP6 formülasyonlarında ise 6 gün boyunca ölçülebilen SP aktivitesi değerleri tespit edilmiştir. Ölçüm sonuçları, SP içermeyen jel formülasyonlarından elde edilen salım örneklerinin kör olarak kullanılması ile hesaplanmıştır.

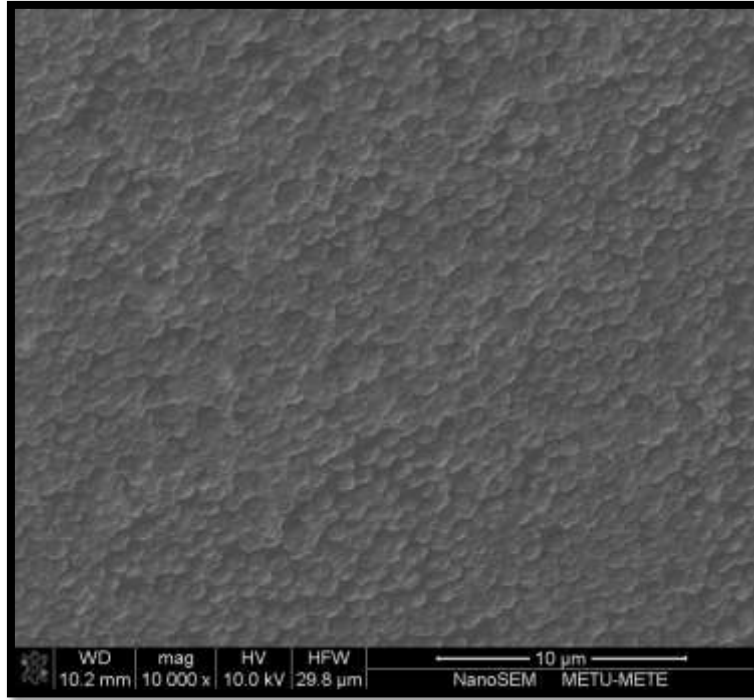


Şekil 4.37. İlaç içeren steril pluronik jel formülasyonlarından elde edilen salım numuneleri üzerinde yapılan serratiopeptidaz aktivitesi deney sonuçları (n=6) (Formülasyon kodları için bkz. Tablo 3.5.)

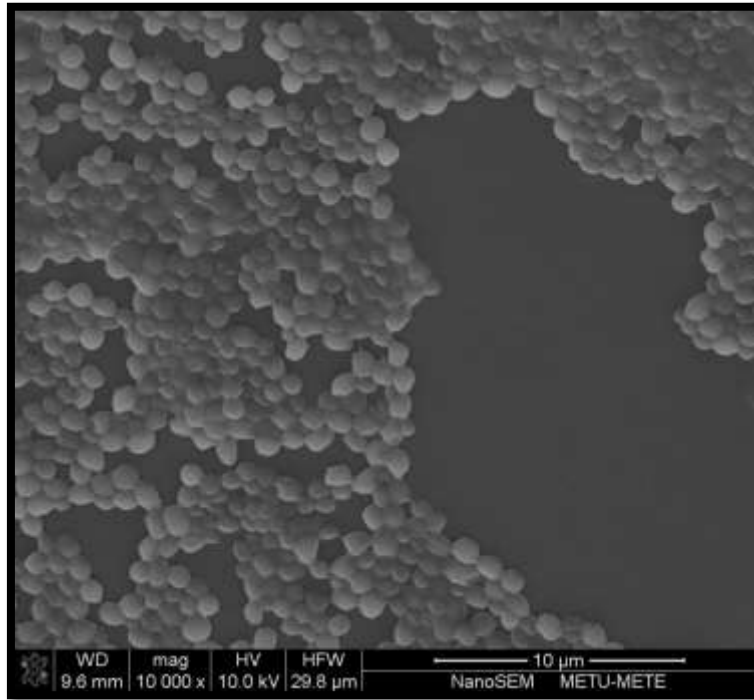
4.3.2.3.3.4.4. Hazırlanan Steril Preparatların *In Vitro* Antibiyofilm Aktivitesinin İncelenmesi

4.3.2.3.3.4.4.1. *In Vitro* Ortamda Biyofilm Oluşturulması

Bölüm 3.2.3.6.1.'de anlatıldığı gibi mikrotitrasyon plaklarında biyofilm oluşturulmuştur. Yöntemin çalışabilirliğinin tespit edilmesi amacı ile, ilaç yüklü steril jel formülasyonlarının uygulanmasından önce, VA ve SP'nin pH 7,4 PBS içerisindeki farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak deneyler yapılmıştır. SP'nin tek başına biyofilm yapısını kırabildiğini göstermek amacı ile, SP içeren pH 7,4 PBS çözeltisi ile kontrol grubu olarak sadece pH 7,4 PBS tampon çözeltisi uygulanmış biyofilm içeren kuyucukların SEM (Nova Nanosem 430) görüntüleri çekilmiş ve serratiopeptidazın biyofilmi parçaladığı Şekil 4.38.'de gösterilmiştir.



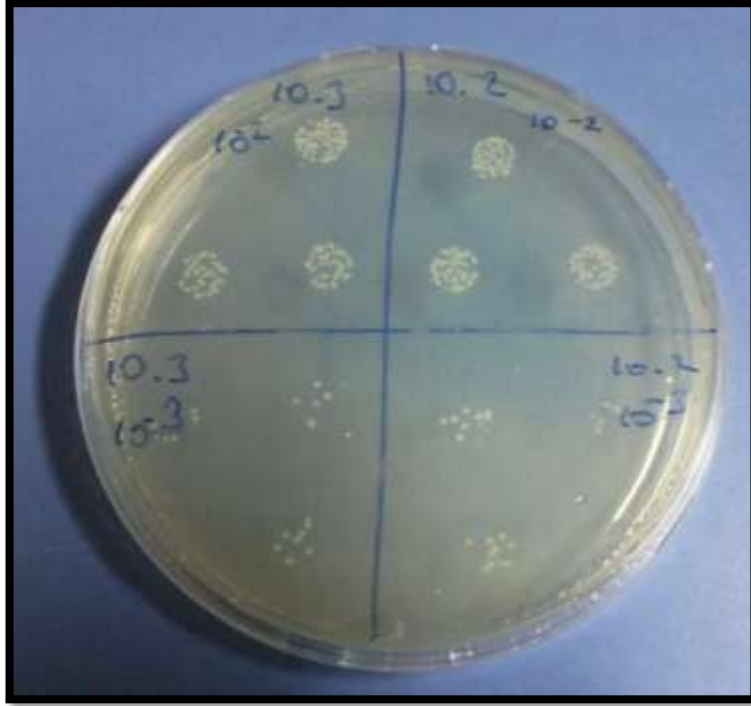
(A)



(B)

Şekil 4.38. Mikrotitrasyon plağı kuyucukları içerisinde oluşmuş biyofilm tabakası
(A: SP uygulanmamış, B: SP uygulanmış)

Yöntemin uygulanabilirliğinin gösterilmesi amacı ile farklı konsantrasyonlarda SP ve VA içeren PBS pH 7,4 çözeltileri ile ön denemeler yapılmıştır. Şekil 4.39.'da SP ve VA içeren PBS pH 7,4 çözeltileri ile muamele sonrasında biyofilmi oluşturan *S. epidermidis* bakterilerinin sayılarını belirlemek amacıyla TSA besiyeri içeren plaklara ekilmesi sonrası oluşan kolonileri görülmektedir.



Şekil 4.39. SP ve VA içeren PBS pH 7,4 çözeltileri ile muamele sonrasında biyofilm oluşturan *S. epidermidis* bakterilerine ait koloniler

Tablo 4.18.'de farklı konsantrasyonlarda serratiopeptidaz ve vankomisin HCl içeren PBS pH 7,4 çözeltilerinin içerikleri ve elde edilen deney sonuçları görülmektedir. Her bir çözelti VA'nın farklı konsantrasyonlarına karşı SP içermeyen veya artan miktarlarda SP içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 4.18. SP ve VA içeren PBS pH 7,4 çözeltilerinin içerikleri ve antibiyofilm aktivitesi sonuçları

Vankomisin HCl Konsantrasyonu	Serratiopeptidaz miktarı (VA kons.x jeldeki oran)	Çözelti ile inkübasyon sonucu üreyen koloni sayısı (n=3) (cfu/mL)	SONUÇ
3 mg/mL	x 0	*tntc	Antibiyofilm Aktivitesi gösterilmiştir
	X 50a	4,2x10 ⁶	
	X200a	3,9 x10 ⁶	
256 µg/mL	X 0	tntc	Antibiyofilm Aktivitesi gösterilmiştir
	X 50a	3,76 x10 ⁶	
	X 200a	3,8 x10 ⁶	
16 µg/mL	X 0	*tntc	Antibiyofilm Aktivitesi VA konsantrasyonunun yetersiz kalması nedeni ile gösterilememiştir
	X 50a	*tntc	
	X 200a	*tntc	
256 µg/mL	X 0	*tntc	Antibiyofilm Aktivitesi gösterilmiştir
	X10a	*tntc	
	X 25a	1,5 x10 ⁶	
	X 50a	2,2 x10 ⁶	

*tntc: too numerous to count

4.3.2.3.3.4.4.2. İlaç Yüklü Jel Formülasyonlarının Antibiyofilm Aktivitesinin Gösterilmesi

Bölüm 3.2.3.6.2.1.'de anlatıldığı şekilde, ileri formülasyon çalışmaları sonucu seçilen, 16 mg VA, 2,5 mg veya 5 mg SP ve 100 mg, 250 mg, 300 mg ve 500 mg VA yüklü yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanmış steril pluronik jel formülasyonlarının (sırası ile JP3, JP4, JP5, JP6) ve bu formülasyonların SP içermeyen şekillerinin in vitro antibiyofilm aktivitesi değerlendirilmiş, ancak SP

içeren ve SP içermeyen jel formülasyonlarının in vitro antibiyofilm aktiviteleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu sonuçlar bize VA ile SP arasında, jel formülasyonunun pH'sına bağlı bir etkileşim olduğunu gösterdiğinden formülasyonlarda değişikliğe gidilmiştir. Değiştirilen içerikler Tablo 4.19.'da görülmektedir.

Farklı miktarlarda F8 formülasyon kodlu mikroküre ile serbest halde VA ve SP içeren, steril pluronik jel formülasyonları (PBS pH 7,4 tamponu ile hazırlanan) hazırlanarak bu yöntem ile antibiyofilm aktiviteleri denenmiştir. Tablo 4.19.'da görüldüğü gibi serratiopeptidaz içermeyen formülasyon ile muamele edilen biyofilm tabakasından elde edilen koloni sayısı ortalama $1,64 \times 10^7$ (n=9) iken, 25 mg SP içeren formülasyon ile muamele edilen biyofilm tabakasından elde edilen koloni sayısı ortalama $7,7 \times 10^6$ 'ya düşmüştür.

Tablo 4.19. Biyofilm tabakası üzerine yerleştirilen ilaçlı steril jel formülasyonları ve inkübasyon sonucunda üreyen koloni sayıları

Formülasyon Kodu*	Formülasyon (0,5 mL Pluronic Jel)	Koloni Sayısı (cfu/ml) n=9
JP7	200 mg MK 0 SP 4 mg VA	$1,64 \times 10^7$
JP8	200 mg MK 25 mg SP 4 mg VA	$7,7 \times 10^6$
JP9	200 mg MK 50 mg SP 4 mg VA	$1,8 \times 10^7$
JP10	100 mg MK 0 SP 4 mg VA	N.D.**
JP11	100 mg MK 25 mg SP 4 mg VA	$1,2 \times 10^7$
JP12	100 mg MK 50 mg SP 4 mg VA	$5,43 \times 10^7$

*bkz. Tablo 3.7.

** N.D.: Not determined

Antibiyofilm aktivitesi en yüksek olan jel formülasyonu 200 mg mikroküre, 25 mg SP, 4 mg VA içeren JP8 formülasyonu olmuştur. Bu nedenle *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere bu formülasyon seçilmiştir.

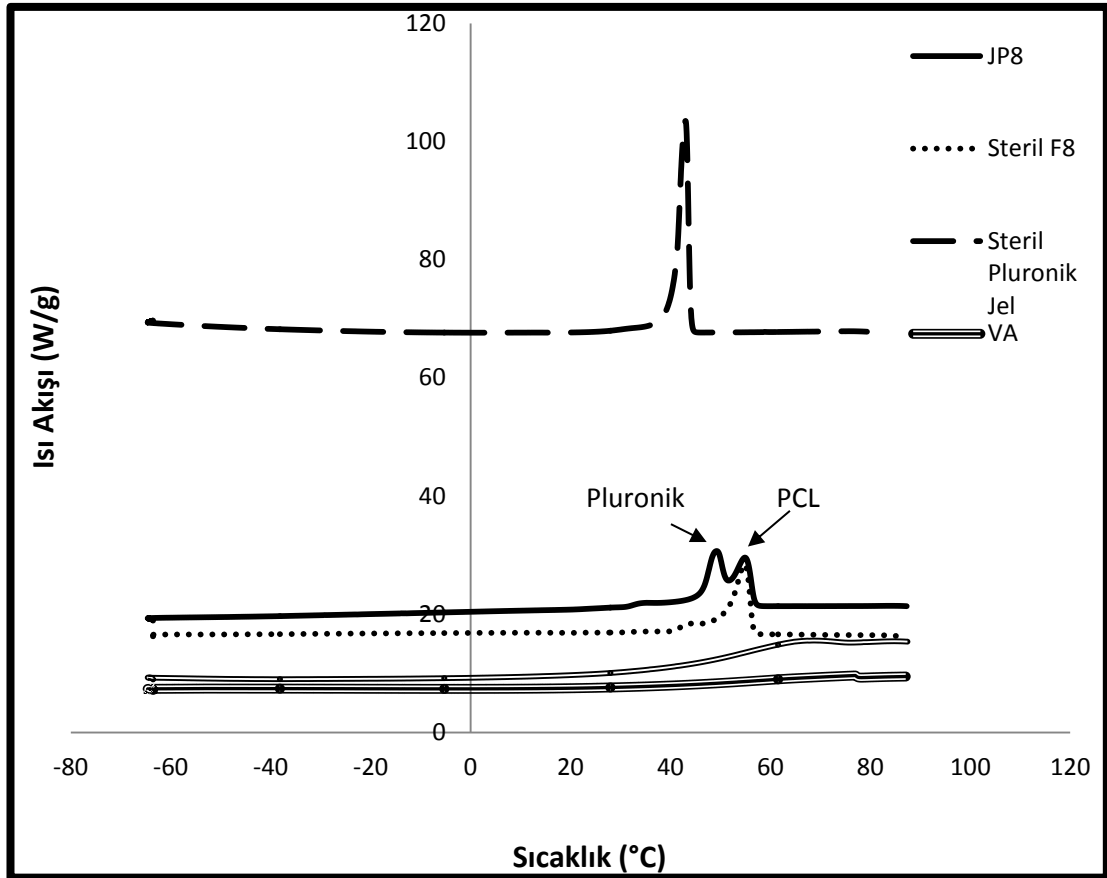
Bu formülasyonun *in vitro* salım deneyleri yapılarak VA salım profili, salınan VA'nın kimyasal ve mikrobiyolojik aktivitesi, salınan SP'nin aktivitesi ve salım örneklerinin *in vitro* antibiyofilm aktivitesi değerlendirilmiştir.

4.3.2.3.3.4.5. Steril Sonuç Jel Formülasyonu Üzerinde Yapılan *in vitro* Deneyler

4.3.2.3.3.4.5.1. Steril Sonuç Jel Formülasyonunda Kullanılan Enzim-Antibiyotik-Polimerler Arasındaki Olası Etkileşimlerin İncelenmesi

İlaç yüklü steril sonuç jel formülasyonda kullanılan VA, SP ve VA yüklü mikroküre ile pluronik jel arasında olası kimyasal etkileşimlerin varlığını değerlendirmek amacı ile yapısal inceleme için Bölüm 3.2.3.6.3.'te anlatıldığı şekilde DSC analizleri yapılmıştır.

DSC termogramları incelendiğinde, ilaç yüklü steril pluronik jelin DSC termogramında, PCL'ye ait erime piki ve pluronike ait erime piklerinin yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.40. Steril sonuç jel formülasyonuna ait DSC termogramı

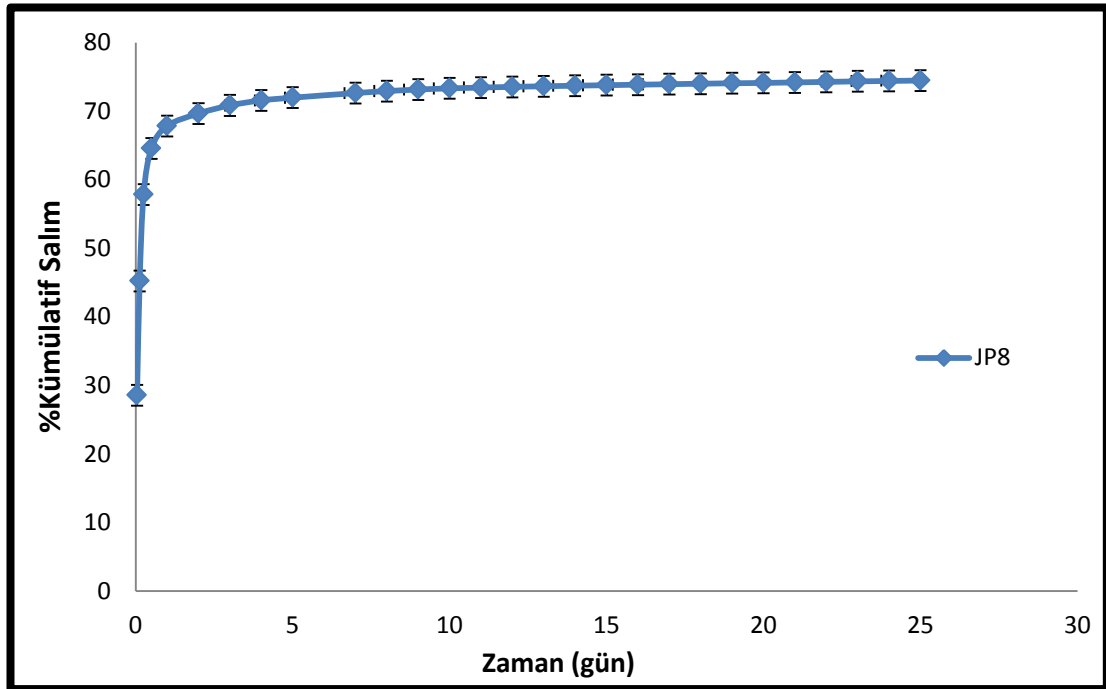
4.3.2.3.3.4.5.2. Steril Sonuç Jel Formülasyonundan *in vitro* Salım Deneyleri

In vitro antibiyofilm aktivitesi deneyleri sonucu, antibiyofilm aktivitesi en yüksek bulunan ilaç yüklü steril jel formülasyonu sonuç formülasyon olarak seçilmiş ve bu formülasyonun Bölüm 3.2.3.6.4.'te anlatıldığı şekilde *in vitro* salım deneyleri yapılmıştır. Buna göre *in vitro* antibiyofilm aktivitesi en yüksek olan jel formülasyonunun JP8 formülasyon kodlu, 0,5 mL steril pluronik jel içerisinde 4 mg serbest VA, 25 mg serbest SP ve 200 mg yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanmış VA yüklü mikroküre içeren jel formülasyonu olduğu yapılan deneyler sonucu görülmüştür.

4.3.2.3.3.4.5.2.1. Steril Sonuç Jel Formülasyonundan VA Salım Profili

Steril sonuç jel formülasyonundan *in vitro* salım deneyleri Bölüm 3.2.3.6.4.1.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Her örnek alma zamanında salım ortamının tamamı alınarak VA miktar tayini için HPLC analizi yapılmış, yerine aynı hacimde taze ortam koyulmuştur. Salım çalışmalarına, salım numunelerindeki VA kondastrasyonu HPLC analizi ile tespit edilemez düzeye inene kadar devam edilmiştir.

Steril sonuç jel formülasyonundan VA salım profili incelendiğinde, birinci gün sonunda jel formülasyonundaki total VA'nın %67,8'inin, ikinci gün sonunda %69,9'unun, yirmibeşinci gün sonunda ise %74,5'inin salındığı görülmüştür. Elde edilen VA salım profili Şekil 4.41.'de görüldüğü gibi olmuştur.



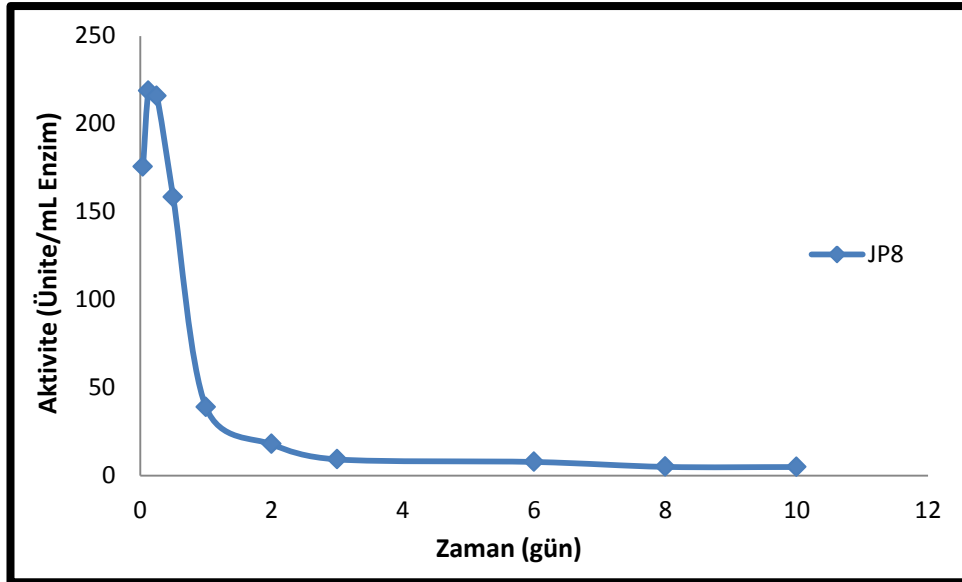
Şekil 4.41. JP8 jel formülasyonundan Zamana karşı % Kümülatif VA Salım profili

4.3.2.3.3.4.5.2.2. Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan SP'nin *in vitro* Aktivitesinin Değerlendirilmesi

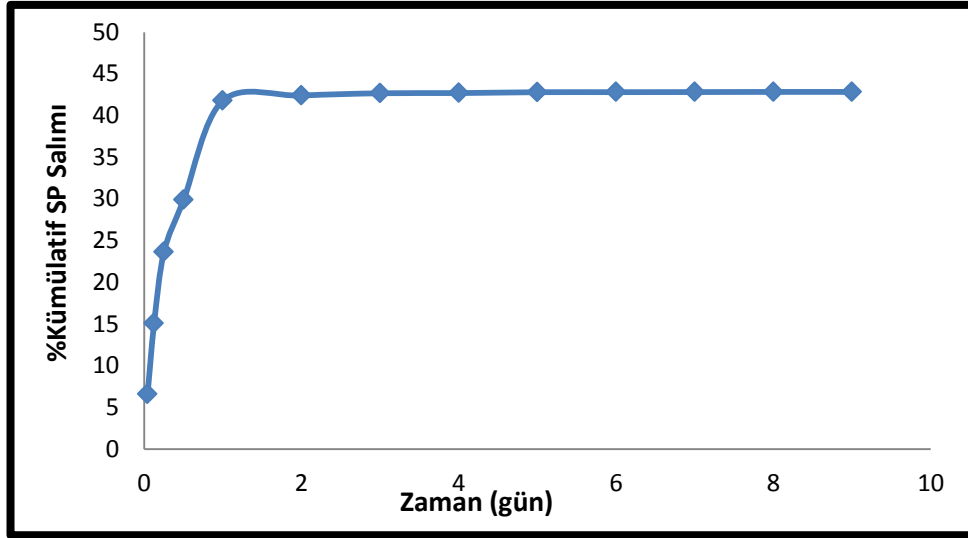
Bölüm 3.2.3.6.5.'te anlatıldığı gibi salım örneklerinde SP aktivitesi tayini yapılmıştır.

0,5 mL steril pluronik jel içerisinde 4 mg serbest VA, 25 mg serbest SP ve 200 mg yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanmış VA yüklü mikroküre içeren jel formülasyonu JP8 formülasyon kodlu sonuç jel formülasyonunda 10 gün boyunca ölçülebilen SP aktivitesi değerleri tespit edilmiştir (Şekil 4.42.). Ölçüm sonuçları, SP içermeyen jel formülasyonlarından elde edilen salım örneklerinin kör olarak kullanılması ile hesaplanmıştır.

Sonuç jel formülasyonundan %kümülatif SP salımı değerleri hesaplandığında, birinci gün sonunda formülasyon içerisindeki total SP'nin %41,8'inin hızlı bir salım ile salındığı görülmektedir (Şekil 4.43.).



Şekil 4.42. Sonuç jel formülasyonlarından elde edilen salım numuneleri üzerinde yapılan serratiopeptidaz aktivitesi deney sonuçları (n=6)



Şekil 4.43. Sonuç jel formülasyonundan zamana karşı % Kümülatif SP salımı profili

4.3.2.3.3.4.5.2.3. Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Salım Örneklerinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Konsantrasyonu belli VA çözeltileri yerine salım numunelerinin kullanılması ile Bölüm 3.1.5.'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Salım numunelerindeki VA'nın MİK değerleri incelendiğinde, salım numunelerindeki VA'nın birinci günden sonra MİK aktivitesi göstermediği görülmektedir.

Tablo 4.20. Salım numunelerinin MİK değerleri

Salım Örneği	MİK Değerleri (çukur sayısı)
1 saat	9
3 saat	9
6 saat	8
12 saat	6
1 gün	6
2 gün	>1
3 gün	>1
4 gün	>1
5-6 gün	>1
7 gün	>1
8 gün	>1
9 gün	>1

4.3.2.3.3.4.5.2.4. Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Salım Örneklerinin *in vitro* Antibiyofilm Aktivitesi

Bölüm 3.2.3.6.5.2.'de anlatılan yöntem ile salım numuneleri kullanılarak gösterilmiştir.

Tablo 4.21. Biyofilm tabakası üzerine yerleştirilen salım numunelerinin inkübasyon sonucunda üreyen koloni sayıları

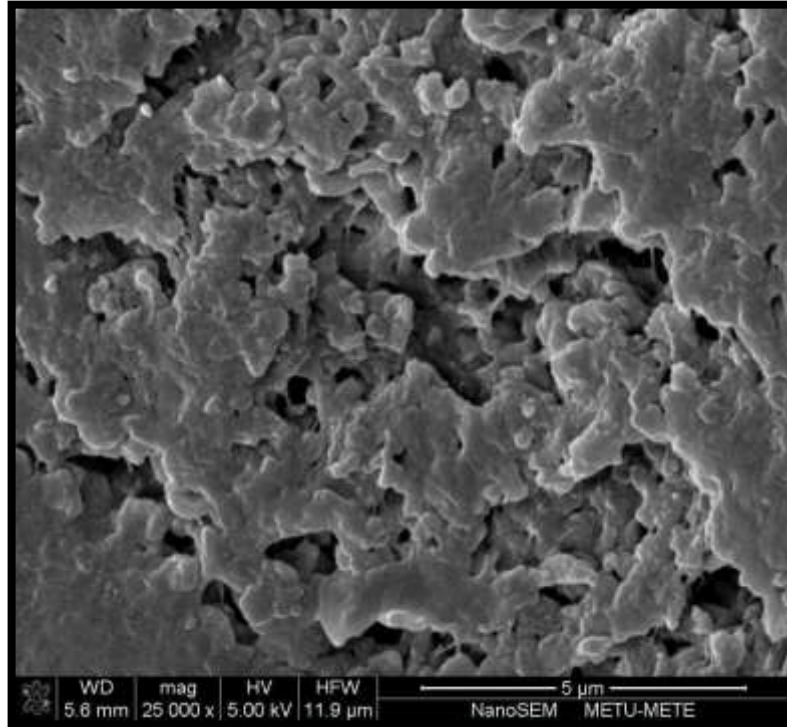
Salım Örneği	Total bakteri sayısı (cfu/ml)
1 saat	9.0×10^4
3 saat	7.2×10^4
6 saat	9.4×10^4
12 saat	5.3×10^4
1 gün	6.6×10^4
2 gün	4.6×10^5
3 gün	7×10^5
4 gün	9.5×10^5
5-6 gün	4.3×10^5
7 gün	5.7×10^5
8 gün	2.5×10^5

4.4. *In vivo* Pilot Çalışmalar

Yeni Zelanda tipi albino tavşanlar kullanılarak *in vivo* koşullarda medikal cihaz uygulamalarına bağlı olarak gelişen biyofilm bazlı osteomyelit taklit edilmeye çalışılmış, tavşanlarda oluşturulan biyofilm bazlı osteomyelitinin tedavisi *in vitro* antibiyofilm çalışmaları sonucu seçilen sonuç jel formülasyonu kullanılarak değerlendirilmiştir.

4.4.1. *In vivo* Çalışmalarda Kullanılacak Biyofilm Kaplı İmplantın SEM Görüntüleri

Tavşanlara cerrahi uygulama yapılmasından önce, biyofilm kaplanan implantların yüzeyinde biyofilm oluşumunun gösterilmesi amacı ile Bölüm 3.2.4.1.'de anlatıldığı şekilde 24 saatlik inkübasyon sonunda biyofilm kaplandığı düşünülen implantların SEM görüntüleri alınmıştır. SEM analizi sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4.45.'de görüldüğü gibidir.

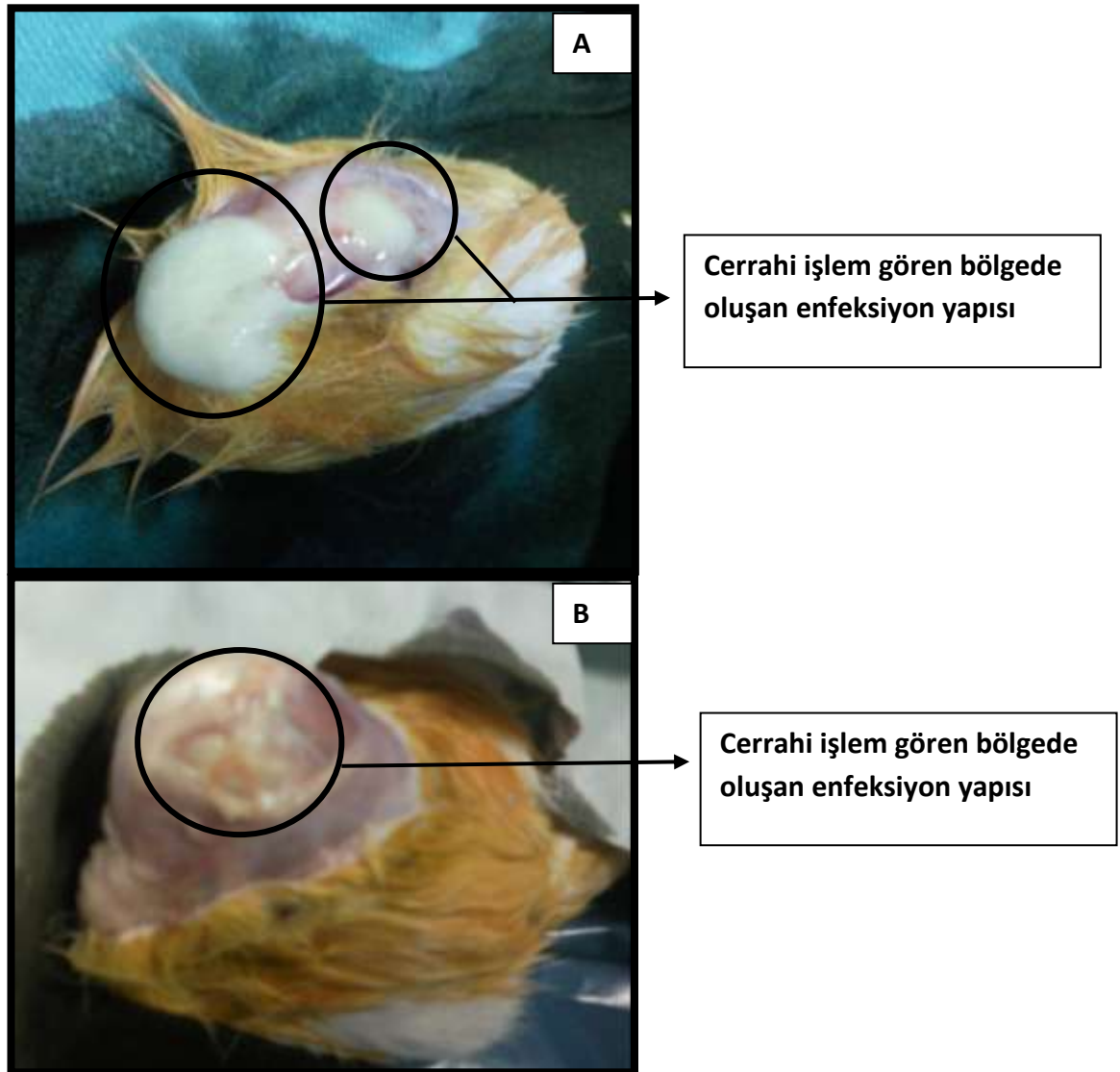


Şekil 4.45. Cerrahi işlem öncesi hazırlanan biyofilm kaplı implant yüzeyi

4.4.2. Tavşanlara Tedavi Uygulamasını Takiben Yapılan Değerlendirmeler

Cerrahi işlem uygulamasını takiben üçüncü hafta sonunda tavşanlar ötenazi edilmiştir. Ötenazi sonrası cerrahi müdahalenin yapıldığı bölge açılmıştır. İlaç uygulanmayan osteomyelit grubu ve ilaç uygulanan tedavi grubundaki tavşanların cerrahi müdahalenin yapıldığı bölgelerinin üçüncü hafta sonundaki görüntüleri Şekil 4.46'daki gibi olmuştur. Şekiller incelendiğinde, tedavi uygulanmayan tavşanda,

tedavi uygulanan tavşana göre gözle görülebilir oranda yüksek biyofilm oluşumu görülmektedir.

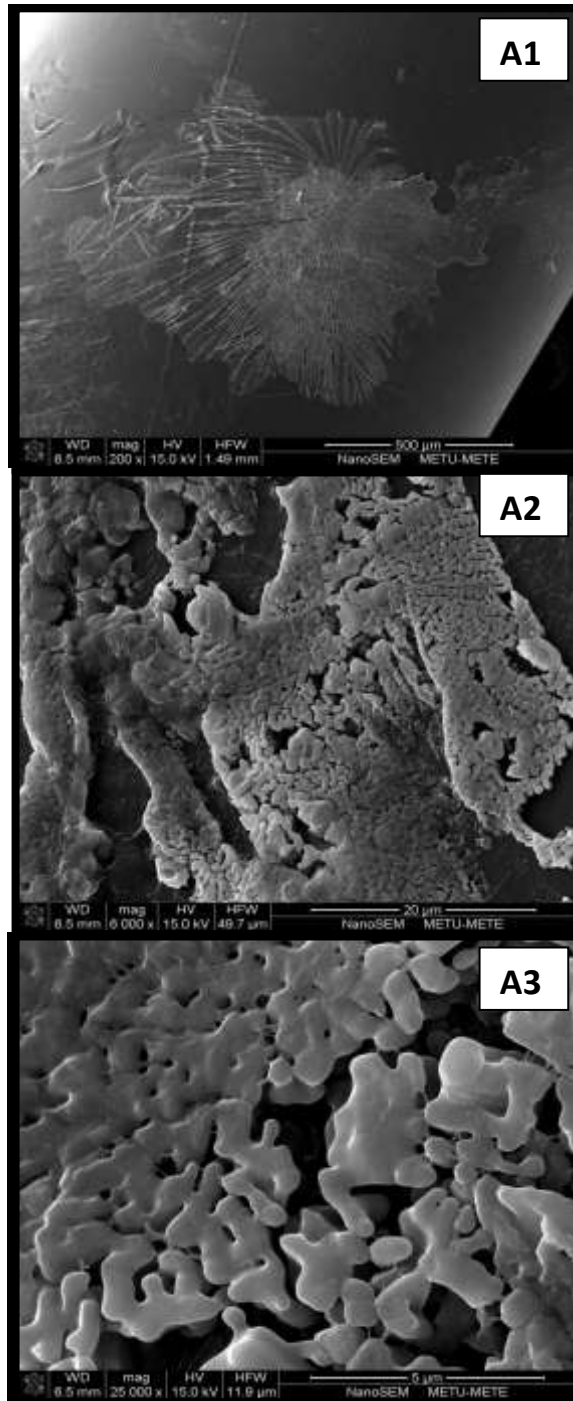


Şekil 4.46. Ötenazi işlemini takiben cerrahi müdahalenin yapıldığı bölgenin görüntüsü **A:** Osteomyelit grubu, **B:** Tedavi grubu

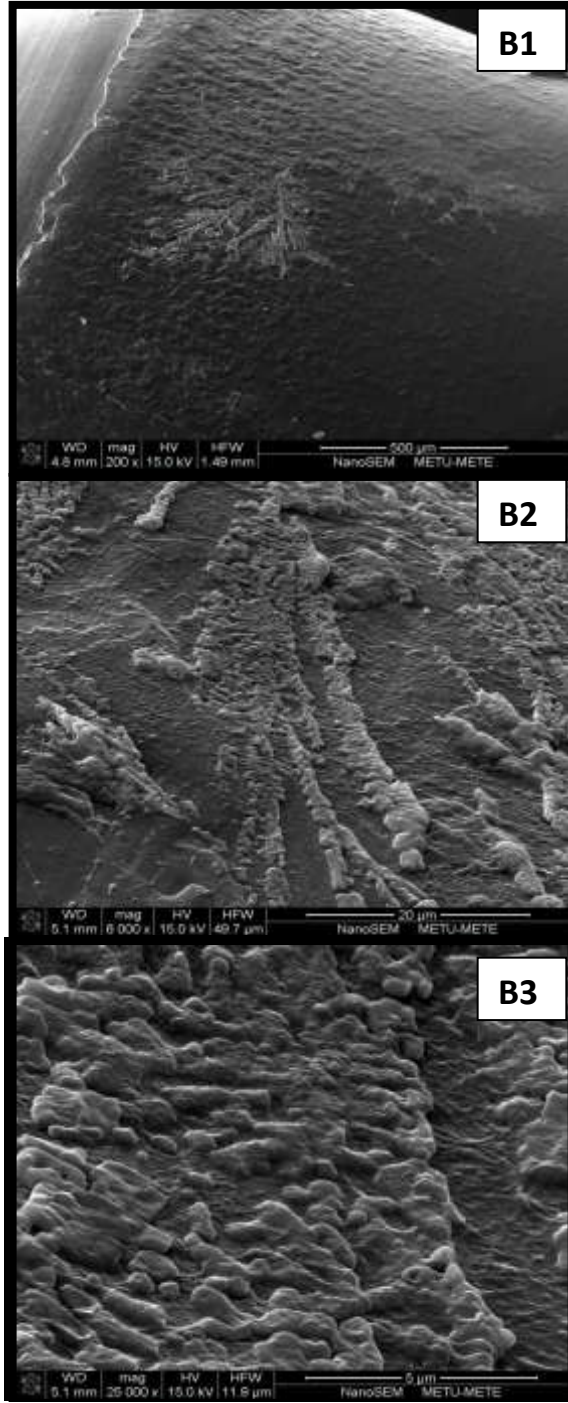
4.4.2.1. Mikrobiyolojik Değerlendirmeler

Tavşanlara cerrahi işlem uygulanmasını takiben üçüncü hafta sonunda tavşanlar ötenazi edilmiş ve cerrahi işlem gören bölge açılarak implantların bir kısmı çıkarılmış ve Bölüm 3.2.4.3.1.'de anlatılan yöntem ile implantlar altınla kaplanarak SEM görüntüleri alınmıştır. Jel formülasyonunun uygulanmadığı kontrol grubundaki tavşandan çıkarılan implanta ait SEM görüntüsü ve jel

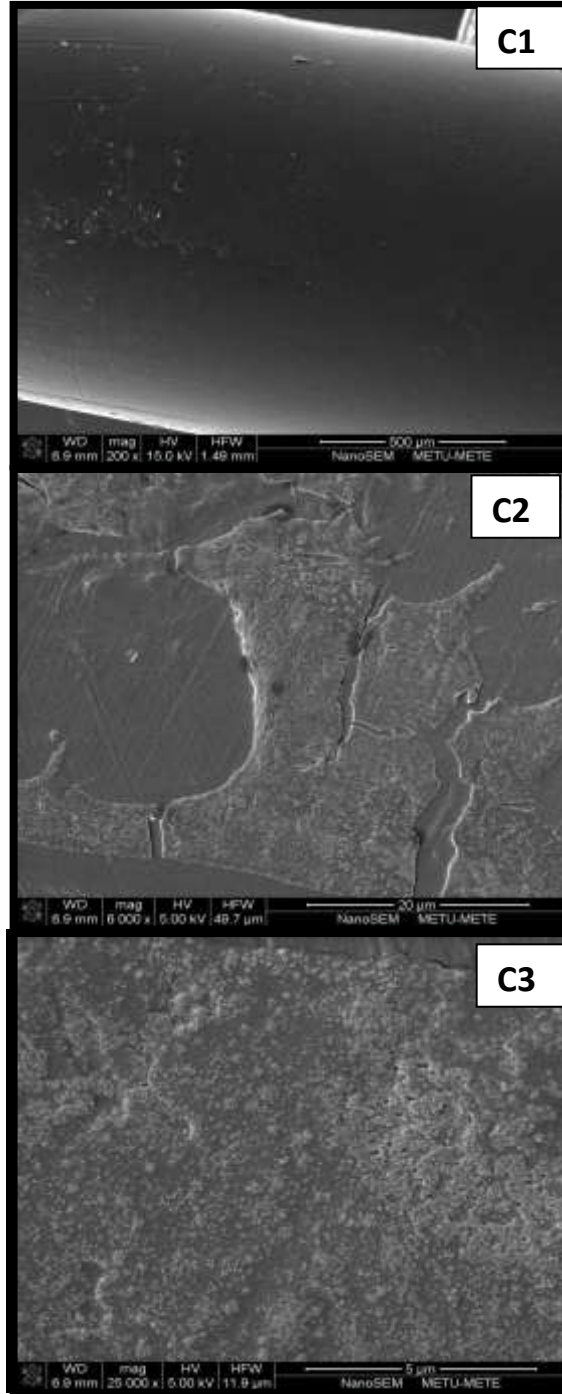
formülasyonunun uygulandığı tedavi gruplarından çıkarılan implantların görüntüleri Şekil 4.47., 4.48. ve 4.49.'da görülmektedir.



Şekil 4.47. A1 (X 200),A2 (X 6000),A3 (X 25000): Osteomiyelit Grubu tavşandan çıkarılan implantın SEM görüntüsü



Şekil 4.48. B1 (X 200), B2 (X 6000), B3 (X 25000): Tedavi Grubu 1 No'lu tavşandan çıkarılan implantın SEM görüntüsü



Şekil 4.49. C1 (X 200), C2 (X 6000), C3 (X 25000): Tedavi Grubu 2 No'lu tavşandan çıkarılan implantın SEM görüntüsü

SEM görüntüleri incelendiğinde, osteomyelit grubu tavşanından çıkarılan implant yüzeyinde oluşan biyofilm tabakasının tedavi grubu tavşanlarından çıkan implant yüzeylerinde oluşan biyofilm tabakasına oranla daha yaygın ve kalın yapıda olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Bu bölümde tez çalışmaları boyunca sürdürülen deneysel çalışmaların ve bu çalışmalardan elde edilen bulguların değerlendirilmesi yapılacak ve bu sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılarak tartışılacaktır. Bu amaçla etkin madde Vankomisin hidroklorürün (VA) fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri, serratiopeptidazın fizikokimyasal özellikleri, VA içeren mikroküre formülasyonlarının hazırlanması, elde edilen mikrokürelerin sterilizasyon öncesi ve sonrası *in vitro* karakterizasyonu (üretim verimleri, partikül büyüklükleri, morfolojik özellikleri, VA yükleme etkinlikleri, *in vitro* deney salım sonuçları, sterilite testleri), steril ilaç ve mikroküre yüklü jel formülasyonlarının hazırlanması, *in vitro* karakterizasyonları (jelleşme sıcaklığı, viskoziteleri, pH değerleri, *in vitro* VA salım sonuçları, salınan SP'nin aktivite sonuçları), *in vitro* biyofilm oluşturulması ve jel formülasyonlarının antibiyofilm aktivitelerinin incelenmesine ilişkin deneysel bulgular değerlendirilmiştir.

5.1. Vankomisin Hidroklorürün Fizikokimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri ile ilgili Çalışmalar

Tez çalışmamızda, formülasyon çalışmalarına başlamadan önce antimikrobiyal etkin madde olan VA ile ilgili fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikler incelenmiş, sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılarak maddenin standardizasyonu ve saflık kontrolleri yapılmıştır. Bu amaçla, öncelikle VA'nın erime derecesi ölçülmüş, UV ve IR spektrumları alınmıştır. Buna göre, VA'nın pH 7,4 fosfat tamponunda literatüre uygun olarak (101) 280 nm'de maksimum absorpsiyon verdiği saptanmıştır (Şekil 4.1.). VA'nın Bölüm 3.1.3.'te belirtildiği şekilde çekilen IR spektrumunda, 600-1000 cm^{-1} dalga boyları arasında görülen yoğunluk, aromatik halkanın varlığını göstermektedir. 3291, 1664, 1508, 1399, 1229, 1127, 1062, 1025 ve 147 cm^{-1} dalga boylarında gözlenen absorpsiyon bantları (Şekil 4.2.) ve ayrıca DSC termogramları (Şekil 4.3.) da literatür bulgularıyla uyumlu bulunmuştur (121,122) MİK konsantrasyonunu saptamak için Bölüm 3.1.5.'te anlatıldığı şekilde yapılan tayinde VA'nın MİK değeri 2 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.

VA'nın *Staphylococcus epidermidis* bakterisine karşı MİK değerinin ≤ 4 µg/mL aralığında olduğu literatürde bildirilmektedir (111) .

5.1.1. Vankomisin Hidroklorürün Miktar Tayini ve Validasyonu

Vankomisinin miktar tayini için literatürde, mikrobiyolojik yöntemler (100) , kütle spektroskopisi (101) , biyoassay, radyoimmünoassay (RIA), floresans polarizasyon immünoassay (FPIA) (102) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (103-105) yöntemleri kullanılmaktadır. Tezimizde, *in vitro* çalışmalar için, bu yöntemler içinde düşük miktarlardaki VA'yı yüksek hassasiyet ve doğruluk ile en hassas ve özgün bir şekilde saptayan yöntem olması nedeni ile HPLC yönteminin kullanımına karar verilmiştir.

VA'nın 9 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon doğrusu ve kalibrasyon doğrusuna ilişkin denklem Şekil 4.5.'te verilmiştir. Validasyon parametrelerinden regresyon katsayısı 0,9993 olarak hesaplanmıştır. Böylece, bu değerler ile çalışılan aralıkta VA için elde edilen kalibrasyon doğrusunun doğrusallığı gösterilmiştir. Bu kapsamda ayrıca, tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve günler arası farklılık ile analiz süresince stabilite, gözlenebilirlik sınırı ve alt tayin limiti saptanmıştır. Literatüre göre, varyasyon katsayısının (VK) %2'nin altında olması istenmektedir. VK'nın %2'nin altında olması, yöntemin istatistiksel yayılımının düşük olduğunu, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik değerlerinin kabul edilebilir ölçüde fark gösterdiğini belirtmektedir. Elde edilen değerlere ilişkin varyasyon katsayıları (VK<%2) ile tayinin hassas ve tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmış, ayrıca formülasyonlarda kullanılacak maddelerin ve ortamların analiz esnasında birbiriyle herhangi bir girişim oluşup oluşturmadığı Bölüm 3.2.1.5.1.4.'te anlatıldığı şekilde incelenmiş ve formülasyonlara giren PCL mikrokürelerin salım ortamı içerisindeki örnekleri, su içerisinde kitosan çözeltisi, su içerisinde pluronik çözeltisi, su içerisinde SP çözeltisinin VA'nın HPLC analizi koşullarında VA piki ile herhangi bir girişim yapmadığı gösterilmiştir.

5.2. Serratiopeptidazın Fizikokimyasal Özellikleri ile ilgili Çalışmalar

Serratiopeptidazın fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi amacı ile Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı üzere UV ve FT-IR spektrumları ve DSC termogramı çekilmiştir.

5.2.1. Serratiopeptidazın UV Spektrumunun İncelenmesi

Serratiopeptidazın Bölüm 3.2.2.1.'de anlatıldığı şekilde pH 7,4 PBS tamponu içerisinde $\lambda=200-400$ nm aralığında, UV Spektrumu çekilmiş ve maksimum dalga boyu (λ_{max}) 280 nm olarak belirlenmiştir. Serratiopeptidazın maksimum dalga boyu ve absorbans spektrumu hakkında literatürde 375 nm (123) , 230 nm (124,125) gibi farklı bulgular söz konusudur.

5.2.2. Serratiopeptidazın FT-IR Spektrumunun İncelenmesi

Bölüm 3.2.2.2.'de anlatıldığı şekilde çekilen serratiopeptidazın FT-IR spektrumunu incelendiğinde, C-H bağlarına ait gerilim bandı, amid yapısına özgü C=O gerilim bandı, N-H bağının deformasyon titreşimi, C-N bağının gerilim bandı ve ester yapısına ait C-O bandı gözlenmiş ve bulgular literatür ile uyumlu bulunmuştur (125) .

5.2.3. Serratiopeptidazın DSC Termogramının İncelenmesi

SP'nin DSC termogramı Bölüm 3.2.2.3.'te anlatıldığı gibi çekilmiştir. DSC termogramı incelendiğinde, SP'nin sabit bir erime noktasının olmadığı, 80-90 °C arasında yayvan bir pik verdiği görülmüştür. Literatür verileri incelendiğinde SP'nin DSC termogramını veren herhangi bir çalışma bulunamamıştır.

5.3. Formülasyon Çalışmaları

5.3.1. Mikroküre Formülasyonlarının Hazırlanması

Biyofilm bazlı medikal cihaz kaynaklı osteomyelitin tedavisi en az 6 haftalık antibiyotik tedavisi gerektirmektedir, bu nedenle, uzun süreli ilaç salımı sağlayabilen bir polimere ihtiyaç duyulmuştur. Mikrokürelerin hazırlanması amacıyla biyouyumlu ve biyoparçalanır, parçalanma ürünleri asidik mikroçevre oluşturmayan ve yüklenen etkin maddeyi 1 yıla kadar salabilen bir polimer olan polikaprolakton (PCL) seçilmiştir (126) . Mikroküre formülasyon çalışmalarında PCL'nin üç farklı molekül ağırlığına sahip tipi (düşük Mw 14.000, orta Mn 60.000 ve yüksek Mn 70.000-90.000) denemeye alınmıştır.

PCL polimeri ile farklı üretim teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiş mikroküre çalışmaları literatürde yer almaktadır (49,127-129) . Tez çalışmamızda, suda çözünen etkin maddelerin enkapsülasyonunu artırması ve istenen mikroküre boyutlarının hazırlama şeklindeki modifikasyonlar ile kolaylıkla elde edilebilir olması nedenleri ile çift emülsiyon (double emulsion) (s/y/s) oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi seçilmiştir (69,70,130) .

Bu yöntemin esası, suda çözünen etkin madde ve uygun bir yüzey aktif madde içeren sulu iç fazın, uygun organik bir çözücü içerisinde çözülmüş olan polimer çöeltisi ile karıştırılarak ilk emülsiyonun oluşturulması (s/y), sonrasında bu emülsiyonun uygun bir yüzey aktif madde içeren sulu dış faz çöeltisi içerisine damla damla sürekli karıştırılarak ilave edilmesi ile çift emülsiyon oluşumu ve oda sıcaklığında karıştırma ile emülsiyon damlacıklarını oluşturan polimer çöeltisindeki organik çözücünün uçurulması ile mikrokürelerin eldesine dayanmaktadır (69)

Literatür araştırmaları sonucu, PCL polimeri ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak mikroküre hazırlanmasında en yaygın kullanılan organik çözücünün diklorometan (DCM), stabilizan olarak en yaygın kullanılan suda çözünen yüzey aktif maddenin de polivinil alkol (PVA) olduğu belirlenmiş, bu nedenlerle tez çalışmamızda PCL'yi çözmek amacı ile DCM, su ve organik faz arası yüzey gerilimini düşürerek emülsiyon oluşumunu artırmak amacı ile yüzey aktif madde olarak da PVA'nın kullanılmasına karar verilmiştir (49,127,130,131) .

Yapılan ön formülasyon çalışmalarında değişik çözücü oranları (diklorometan-DCM) (%5, %10, %15, %20, %30), karıştırma hızı (500-1000 rpm), iç ve dış sulu faz polivinil alkol (PVA) oranları (%0,05-0,1) ve düşük molekül (M_w 14.000) ağırlıklı PCL polimeri kullanılarak boş mikrokürelerde partikül boyutu ayarlanmıştır. Ön çalışmalar sonucu seçilen çözücü (%20), iç ve dış faz PVA (%0,05-0,1/%0,05) oranları ile karıştırma hızı (1000 rpm) sabitlenerek aynı koşullarda orta (M_n 60.000) ve yüksek molekül ağırlıklı (M_n 70.000-90.000) PCL ile de mikroküreler hazırlanmıştır.

Ön formülasyon çalışmaları sırasında, çift emülsiyon oluşumunun hemen sonrasında, mikrokürelerin küresellikleri ve çift emülsiyon oluşumunun sağlanıp sağlanmadığı Leica optik mikroskobu kullanılarak araştırılmış, bütün formülasyonların küresele yakın oldukları ve çift emülsiyon oluşumunun gerçekleştiği gözlenmiştir.

Çalışmalar sırasında, polimeri çözen DCM oranı sabitlendiğinde, molekül ağırlığı arttıkça polimer çözeltisinin viskozitesinin arttığı, bunun sonucu olarak çift emülsiyonun oluşumu sonrasında DCM'nin uzaklaştırılması için yapılan karıştırma esnasında, çözücü buharlaşmadan mikrokürelerde çökme gerçekleştiği, bunun da üretim veriminde azalmaya neden olduğu görülmüş; ancak aynı şekilde polimer çözeltisinin viskozitesindeki artış ile oluşan partiküllerin boyutlarının arttığı gözlenmiştir. Literatürde Yang ve diğerlerinin farklı molekül ağırlıklı PCL polimeri kullanarak çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada da molekül ağırlığı arttıkça üretim veriminin azaldığı gösterilmiştir (130).

5.3.2. Mikroküre Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Bu bölümde, çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PCL mikroküre formülasyonları üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları ve sonuçları değerlendirilecektir. Bu amaçla, morfolojik özelliklerin incelenmesi, partikül büyüklüğü tayini, hazırlama verimi, mikrokürelere yüklenen VA miktar tayini çalışmaları ve *in vitro* salım deneyleri değerlendirilerek literatür bulguları ile karşılaştırılmıştır.

5.3.2.1. Morfolojik Özellikler

Ön formülasyon çalışmaları ile optimize edilen ve düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL polimerleri kullanılarak hazırlanan mikroküre formülasyonlarının yüzey özelliklerinin incelenmesi için SEM fotoğrafları çekilmiştir (Bkz. Şekil 4.10., 4.11., 4.12., 4.13.).

SEM fotoğrafları incelendiğinde, düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan etkin madde içeren ve içermeyen mikroküre formülasyonlarında kullanılan iç faz PVA oranının değişmesinin (%0,05 - %0,1) mikrokürelerin yüzey özelliklerini ve küreselliklerini değiştirmedeği gözlenmiştir. Mikroküre formülasyonlarının etkin madde içerip içermemesinin morfolojik özellikler üzerinde etkili olmadığı, bütün formülasyonların tamamen küresele yakın şekilde olduğu ve yüzeylerinin genel olarak pürüzsüz olduğu görülmüştür. Geraldes ve diğerlerinin (132) yapmış olduğu çalışmada da, PCL polimeri ile hazırlanan boş ve etkin madde yüklenmiş mikrokürelerin, etkin madde yükleme sonrası SEM görüntüleri incelendiğinde, etkin maddenin mikrokürenin yüzey özellikleri üzerinde bir değişikliğe yol açmadığı bildirilmektedir.

İncelemelerde, düşük ve orta molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin yüzeylerinde yer yer küçük gözeneklere rastlanırken, yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin yüzeylerinin gözeneksiz yapıda olduğu görülmüştür. Mikrokürelerin iç yapıları incelendiğinde, her üç molekül ağırlığındaki PCL ile hazırlanan mikrokürelerin de gözenekli yapıda olduğu görülmüştür (Şekil 4.12. M,N,O). Ayrıca, molekül ağırlığı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı görülmüştür. Yang ve diğerlerinin yaptığı çalışmada da, molekül ağırlığı arttıkça PCL polimeri ile hazırlanan mikrokürelerin partikül büyüklüğünün arttığı gösterilmiştir (130).

Sonuç olarak, her üç molekül ağırlığındaki PCL ile çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan mikrokürelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde, küresele yakın yapıda ve poröz iç yapıya sahip mikrokürelerin elde edildiği, etkin madde yüklenmiş veya yüklenmemiş olmasının küresel yapıda herhangi bir farklılığa neden olmadığı görülmüş ve literatürde bulgularımızı destekleyen çalışmaların bulunduğu tespit edilmiştir (127,133-135).

5.3.2.2. Mikrokürelerin Üretim Verimi

Mikrokürelerin üretim verimi Bölüm 3.2.3.3.3.'te anlatıldığı şekilde mikrokürelerin liyofilizasyon ile eldesi sonrası hesaplanmıştır. Tablo 4.5.'te görüldüğü gibi formülasyonların üretim verimleri % 47,5 - % 80,9 arasında değişmektedir.

Tablo 4.5. incelendiğinde, VA yüklü ve iç fazlarında %0,05 ile %0,1 oranında PVA içeren ve düşük molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin üretim verimleri sırası ile % 73,11 ile %74,32 olarak belirlenmiştir. Orta molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü mikrokürelerde iç fazında % 0,05 PVA içeren mikrokürelerin üretim verimi % 59,62, % 0,1 PVA içeren mikrokürelerin ise % 60,83 olduğu görülmektedir. Yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan VA yüklü mikroküreler incelendiğinde ise, iç fazında % 0,05 oranında PVA içeren mikrokürelerin üretim verimleri % 47,51, iç fazında % 0,1 oranında PVA içeren mikrokürelerin üretim verimleri ise % 49,8 olarak belirlenmiştir.

Çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanan mikrokürelerde, aynı molekül ağırlığındaki PCL polimeri ile hazırlanan boş ve VA yüklü mikrokürelerde, iç faz PVA oranının %0,05'ten %0,1'e artırılması ile mikroküre üretim verimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Aynı konsantrasyonda PCL polimeri içeren farklı molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan mikrokürelerde molekül ağırlığının artması ile mikroküre üretim verimi anlamlı oranda azalmıştır. Üretim verimindeki bu azalmanın, polimer molekül ağırlığı arttıkça polimer çözeltilisinin viskozitesinin artması ve bunun sonucu olarak ikincil emülsiyonun damlacık boyutlarının büyümesi, ikincil emülsiyonun oluşumu sonrasında DCM'nin uzaklaştırılması için yapılan karıştırma esnasında, çözücü buharlaşmadan mikrokürelerin ağırlığından dolayı çökmeye başlaması nedeni ile olduğu düşünülmektedir. Literatürde Yang ve diğerlerinin farklı molekül ağırlıklı PCL polimeri kullanarak çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada da molekül ağırlığı arttıkça üretim veriminin azaldığı gösterilmiştir (130) .

5.3.2.3. Partikül Büyüklüğü Tayini

Çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemine göre elde edilen mikrokürelerin partikül büyüklüklerini etkileyen faktörler arasında, karıştırma hızı, karıştırıcının geometrisi, dispers ve sürekli fazların viskoziteleri, iki faz yüzeyleri arası yüzey gerilimi, polimer konsantrasyonu, stabilizan türü ve konsantrasyonu, karıştırma süresi ve sıcaklığı yer almaktadır(130,136-139) .

Ön formülsayon çalışmaları sonucunda, partikül büyüklüğü ve dağılımını etkileyen bu parametrelerin optimize edilerek sabit tutulmasına karar verilmiştir. Karıştırma hızı 1000 rpm, polimer konsantrasyonu %20, iç faz stabilizan olarak PVA konsantrasyonu %0,05 ile %0,1, karıştırma süresi iki saat, karıştırma sıcaklığı oda sıcaklığı olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu yol ile, partikül büyüklüğü ve dağılımı üzerinde etkili olan yöntem parametrelerinin etkisi kontrol altında tutulmuştur.

Bölüm 3.2.3.3.2.'de verildiği şekilde, düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklükleri incelendiğinde, partikül büyüklüklerinin 58,05-134,12 μm aralığında yer aldığı görülmektedir. Literatürde, çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile PCL polimeri kullanılarak hazırlanan mikroküre çalışmalarında da benzer boyutlar elde edilmiştir (133,134,140) . Literatürde ayrıca farklı molekül ağırlıklı PCL mikroküreleri ile çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin, aynı deney şartları kullanılmasına rağmen, partikül boyutlarının farklı elde edilmesi, kullanılan PCL polimerinin molekül ağırlıklarının farklı olmasından kaynaklandığı, bunun nedeninin polimer molekül ağırlığı arttıkça polimer çözeltisinin viskozitesinin artmasından kaynaklı olabileceği Yang ve diğerlerinin yaptığı çalışmada belirtilmiştir (130,141) .

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, hazırlanan mikrokürelerin VA yüklü ve boş formlarının partikül büyüklükleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0,05$). Ayrıca, aynı molekül ağırlıklı PCL polimerleri ile hazırlanan mikroküre boyutlarında, iç faz PVA oranlarının değişmesi ile anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$); PCL molekül ağırlığı arttıkça elde edilen mikrokürelerin partikül büyüklüklerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p<0,05$) fark oluştuğu görülmüştür.

Mikrokürelere ait partikül büyüklüğü dağılımı grafikleri incelendiğinde, bütün mikroküre formülasyonlarının monodispers dağılımda partikül büyüklüğüne sahip oldukları görülmektedir (Bkz. Şekil 4.14.).

Hazırlanan mikrokürelerin SEM görüntüleri incelendiğinde, mikroküre partikül büyüklüğü dağılımının homojen olduğu, aynı polimer konsantrasyonunda molekül ağırlığı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı görülmektedir (Bkz. Tablo 4.4.). Aynı konsantrasyonda farklı molekül ağırlığında PCL polimeri içeren PCL çözeltileri ile hazırlanan mikrokürelerde benzer şekilde polimer molekül ağırlığı arttıkça partikül boyutlarının arttığına ilişkin bulgular literatürde bulunmaktadır (142) . Ayrıca, partikül büyüklüğü arttıkça enkapsülasyon etkinliği ile ilaç salım süresinin arttığı da literatürde bildirilmektedir (143) .

Tez çalışmalarımızda, amacımız ilaç yüklü steril termosensitif jelin minimum invazyona neden olacak şekilde enjeksiyon yolu ile enfekte bölgeye verilmesidir. *In vivo* çalışmalarda jel formülasyonunu enjekte etmek amacı ile kullanacağımız enjektör ucu 21 G olup, iç çapı 0,514 mm'dir. Bu enjektör yardımıyla enjeksiyon ile enfeksiyon bölgesine verilecek olan sonuç ilaç yüklü steril termosensitif jel formülasyonundaki mikroküre boyutunun, enjektör ucunu tıkamadan geçişi sağlayabilecek boyutlarda ve bölgeye enjekte edilme sonrası en az 6 hafta süre ile etkin maddeyi etkin konsantrasyonda salabilecek salım profiline sahip olması istenmektedir (52) .

Bu amaçla, mikroküre boyutunun küçük modifikasyonlarla kolayca ayarlanabildiği yöntem olan çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi seçilerek 50-150 µm partikül boyutu aralığında mikroküre üretimi gerçekleştirilmiştir.

5.3.2.4. Mikrokürelere Yükelenen Vankomisin Hidroklorür Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Ön formülasyon çalışmaları sonrası optimize edilen düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarına yüklenen VA ve

yükleme etkinliği Bölüm 3.2.3.3.4.'te anlatıldığı şekilde incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6.'da görüldüğü gibi, mikroküre formülasyonlarında kullanılan PCL polimerinin molekül ağırlığının artışı ile iç faza yüklenen VA miktarının da istatistiksel olarak anlamlı miktarda arttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Bu artışın nedeni olarak, PCL polimerinin molekül ağırlığındaki artış ile artan partikül büyüklüğü ile bağlantılı olabileceği düşünülmüştür. İç faz PVA oranlarındaki artışın da, aynı polimer molekül ağırlığına sahip PCL polimerleri ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerinde bir artışa neden olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, polimerin molekül ağırlığı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı görülmektedir. Aynı molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan farklı PVA iç faz konsantrasyonlarına sahip olan mikroküreler değerlendirildiğinde, PVA konsantrasyonunun %0,05'ten %0,1 çıkmasıyla enkapsülasyon etkinliğinde bir artışın meydana geldiği, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Polimer molekül ağırlığı arttıkça daha yoğun polimer sarmalına daha çok etkin maddenin hapsolması nedeni ile polimer moleküllerinin içine aldığı VA miktarı artmıştır. Kim ve diğerlerinin farklı molekül ağırlıklarında PCL polimeri ve felodipin etkin maddesi kullanarak hazırladıkları mikrokürelerde, polimer molekül ağırlığı arttıkça organik fazın viskozitesinin arttığı, bu nedenle etkin maddenin mikroküre sertleşmesi tamamlanmadan dış su fazına difüzyonunun azaldığı, bunun sonucu olarak da polimer molekül ağırlığı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin arttığı belirtilmiştir (144) .

5.3.2.5. FT-IR ile Mikrokürelerin Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.3.5.1.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Boş PCL mikroküre ve VA yüklü mikroküre ile VA'nın FT-IR spektrumları incelendiğinde, VA'nın spektrumuna ait piklerin VA yüklü PCL mikrokürenin spektrumunda bulunmadığı, boş PCL mikroküre ile VA yüklü PCL mikrokürenin spektrumları arasında da farklı

piklerin olmadığı görülmektedir (Bkz. Şekil 4.15.). VA'nın piklerinin VA yüklü PCL mikrokürenin spektrumunda görülmemesi VA'nın tamamının PCL mikroküre içerisine hapsediğini göstermektedir. VA yüklü ve boş PCL mikrokürelerin spektrumları arasında bir fark olamaması da, VA yüklemenin PCL yapısında herhangi bir bozulmaya ve etkileşmeye neden olmadığını göstermektedir. PCL mikrokürelerin FT-IR spektrumları literatür ile uyumlu bulunmuştur (132,145) .

5.3.2.6. DSC ile Mikrokürelerin Termodinamik Özelliklerinin İncelenmesi

Bölüm 3.3.3.5.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Boş PCL mikroküre ve VA yüklü mikroküre ile VA'nın DSC termogramları incelendiğinde, boş PCL mikroküre ile VA yüklü PCL mikrokürenin termogramlarındaki erime piklerinin örtüştüğü görülmektedir. Formülasyona göre PCL polimerinin tek başına VA'nın verdiği yayvan erime piki ile bir etkileşme yapmadığı gösterilmiştir. Etkin madde yüklenmiş mikrokürelerde ise, VA'nın termogramında görülen yayvan erime pikinin, VA yüklü PCL mikrokürenin termogramında ortadan kaybolduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.16.). Bu durum, etkin maddenin, PCL mikroküre matrisi içinde homojen ve katı halde disperse olduğunu, kristalize yapısını ortadan kalkarak amorf halde mikroküre yapısına girdiğini göstermektedir. PCL mikrokürelerin DSC termogramları literatür ile uyumlu bulunmuştur (132) .

5.3.2.7. *İn Vitro* Salım Deneyleri

Literatürde, VA yüklü mikrokürelerden salım çalışmalarında genellikle salım ortamı olarak pH 7,4 PBS tamponu kullanıldığı ve deneylerin 37 °C'de yatay çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirildiği bildirilmektedir, bu nedenle çalışmalarımız sırasında aynı ortamlar kullanılmıştır (121,146,147) .

Tez çalışmalarımızda, düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikroküreler *in vitro* VA salım profilleri Bölüm 3.2.3.3.6.1.'de anlatıldığı şekilde elde edilmiştir (Şekil 4.17. - 4.18.). Formülasyonlar arasında en uzun süreli

salım, yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerde gözlenirken (50 gün), en kısa süreli salım düşük molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan mikrokürelerde gözlenmiştir (1 gün). Orta molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan mikrokürelerde ise VA salımı 18 gün boyunca devam etmiştir. Aynı molekül ağırlığında PCL ile hazırlanan farklı iç faz PVA oranlarına sahip mikrokürelerden VA salım profilleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Her bir formülasyon tipinde altı örnek üzerinden salım çalışması yapılmış, elde edilen zamana karşı % kümülatif salım grafiğinde her bir örnekleme zamanı için varyasyon katsayısı (VK) değerleri %5'ten küçük bulunmuştur. Mikropartiküler sistemler için in vitro salım yöntemi validasyonunun değerlendirilmesinde, VK'nın %5'ten küçük olması istenmektedir. Bu nedenle, mikrokürelerden in vitro salımı incelemek için tezimizde kullandığımız yöntemin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Mikrokürelerden VA salımı, salım örneklerinden HPLC ile analiz sonucu saptanamaz düzeye gelene kadar devam edilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan iç fazında %0,05 ve %0,1 oranında PVA içeren mikrokürelere yüklenen VA'nın %72'si birinci gün sonunda salınmıştır. On sekizinci gün sonunda orta molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan iç fazında %0,05 ve %0,1 oranında PVA içeren mikrokürelere yüklenen VA'nın %100'ü salınırken, ellinci gün sonunda yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan iç fazında %0,05 ve %0,1 oranında PVA içeren mikrokürelere yüklenen VA'nın sırası ile %55 ve %62'si salınmıştır (Şekil 4.14. – 4.15.).

Suda çözünürlüğü yüksek olan etkin maddelerin suda çözünmeyen polimerler ile mikroenkapsülasyonunda, genellikle patlama etkisi ile yüksek konsantrasyonda ilk salım görülmektedir (148,149) . Tezimizde hazırladığımız mikrokürelerden VA salım profilleri incelendiğinde de başlangıçta VA'nın patlama etkisi ile hızlı bir salım profili sergilediği görülmektedir. Ancak partikül büyüklüğünün artması ile yüzey alanı azalmakta, yüzeyde tutunan VA'nın azalması nedeni ile de patlama etkisinin azaldığı görülmektedir (150,151) .

Salım profilleri incelendiğinde yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerden VA salımının yavaş ve uzun süreli olduğu görülmektedir. Literatürde polimer molekül ağırlığının artması ile polimer degradasyonunun yavaşladığı, bu nedenle polimer degradasyonu ile oluşan mikroküre porlarına su

difüzyonu ile salınan suda çözünen etkin maddelerin salım hızının azaldığı bildirilmektedir (152-154) . Yang ve diğ., farklı molekül ağırlıklı PCL polimeri ve etkin madde olarak bovin serum albumin kullanarak yaptıkları çalışmada, patlama etkisi ile ilk hızlı salımın düşük molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan mikrokürelerde daha fazla olduğunu, bunun nedeninin düşük molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin partikül boyutunun daha düşük olması ve bunun sonucu olarak difüzyon için daha büyük bir yüzey alanına sahip olmaları şeklinde açıklamışlardır (130) .

Buna göre, partikül büyüklüğündeki ve polimer molekül ağırlığındaki artışın ilacın enkapsülasyon etkinliğini artırdığı, patlama etkisi ile salımı azalttığı ve salım süresini uzattığı sonucuna ulaşılabilir.

Salım numunelerinde bulunan VA'nın kimyasal olarak stabilitesini koruduğunu göstermek amacı ile yapılan HPLC analizlerinde, saf VA ile salım numunelerindeki VA'nın aynı retensiyon zamanında pik verdikleri görülmüştür. Bu durum salım numunelerinde VA'nın kimyasal stabilitesini koruduğunu kanıtlamaktadır.

5.3.3. PCL Mikrokürelerinin Gama Radyasyon ile Sterilizasyonu ve Sterilite Kontrolü

Ortopedik olarak kullanılacak olan implantların sterilize edilmeleri ve steril koşullar altında implante edilmeleri gerekmektedir (155-157) . İlaç yüklü polimerik mikrokürelerin sterilizasyonunda iyonize radyasyon (gama ışınları) ile sterilizasyon yaygın olarak kullanılan ve yüksek penetrasyon yeteneği, düşük kimyasal reaktivliği, düşük kalıntı düzeyi, örnekte düşük sıcaklık değişikliği ve uygulama esnasında az değişken ile rahatça kontrol edilebilirliği gibi nedenlerle tercih edilen bir yöntemdir (158-161) . USP 36'da 2,5 megarad (Mrad) doz ile sterilizasyonun uygun olduğu, ancak sterilize edilecek malzemenin özelliğine uygun olarak dozun ayarlanması gerektiği belirtilmektedir. Literatürde polimerik mikrokürelerin gama radyasyon ile sterilizasyonunda yaygın olarak 2,5 Mrad (25 kGy) doz kullanılmaktadır (159,162-164) .

Boş ve antibiyotik yüklü PCL mikroküreleri Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda ^{60}Co kaynağı kullanılarak 3.62 kGy/saat hızda 25 kGy dozda gama radyasyon ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası mikroküreler üzerinde USP 36'da belirtilen sterilité testi yapılmış ve formülasyonlar steril bulunmuştur. Mikrobiyolojik çalışmalar sonucu elde edilen sterilité bulguları ile, literatürde 25 kGy doz ile sterilize edilen polimerik mikrokürelerin sterilizasyon sonrası sonuçları ile uyum göstermektedir (12) . Sonuç olarak, 25 kGy doz ile gama radyasyon sterilizasyonunun düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin USP 36'ya uygun sterilité değerlerini sağladığı anlaşılmaktadır.

Tez çalışmalarımızda, boş ve VA yüklü PCL mikrokürelerinin sterilizasyonu için 25 kGy dozda gama radyasyon ile sterilizasyona tabi tutulmuş, sterilizasyon sonrası mikroküreler üzerinde sterilité kontrolü, SEM ile yüzey özelliklerinin incelenmesi, partikül büyüklüğü tayini, VA yükleme etkinliği tayini, in vitro VA salım deneyleri, DSC ile termodinamik özelliklerinin ve FT-IR ile yapısal özelliklerinin incelenmesi yapılmış ve sterilizasyon öncesi ve sonrası bulgular karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

5.3.3.1. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinin Yüzey Özellikleri

Gama radyasyon ile sterilizasyon sonrası mikrokürelerin yüzey özelliklerini incelemek amacı ile SEM görüntüleri çekilmiştir. Şekil 4.13.'te görüldüğü gibi sterilizasyon sonrası düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin formülasyonlarında kullanılan iç faz PVA oranının değişmesi (%0,05 - %0,1) mikrokürelerin yüzey özelliklerini ve küreselliklerini değiştirmemiştir. Mikroküre formülasyonlarının etkin madde içerip içermemesinin morfolojik özellikler üzerinde etkili olmadığı, bütün formülasyonların tamamen küresele yakın şekilde olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.22. – 4.23.).

Düşük ve orta molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin yüzeylerinde yer yer küçük gözeneklere rastlanırken, yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin yüzeylerinin gözeneksiz yapıda olduğu görülmüştür.

Ayrıca, molekül ağırlığı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.22. – 4.23.).

Görüntüler incelendiğinde, sterilizasyon öncesi ve sonrası mikrokürelerin yüzey morfolojileri, şekilleri ve büyüklükleri arasında bir fark gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 4.24. - 4.25.) Sterilizasyon öncesi mikrokürelerin görüntülerine paralel olarak, etkin madde içeren veya içermeyen mikrokürelerin boyutlarının, mikrokürenin hazırlanmasında kullanılan PCL polimerinin molekül ağırlığı arttıkça arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, formülasyonlara etkin madde yüklenmesinin morfolojik özellikler üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Literatürde PCL mikrokürelerin 25 kGy dozla sterilizasyonu sonrası SEM görüntüleri incelendiğinde yüzey morfolojilerinin sterilizasyondan etkilenmediği belirtilmiştir (132) . Bulgularımız literatür verileri ile uyum göstermektedir.

5.3.3.2. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Partikül Büyüklüğünün Tayini

Bölüm 3.2.3.4.3.3.'te verildiği şekilde, düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarının partikül büyüklükleri 60-134 μm aralığında yer almaktadır. Değerler Tablo 4.7.'de verilmiştir. Partikül büyüklüğü değerleri incelendiğinde, düşük molekül ağırlıklı PCL (Mw 14000) polimeri ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarında, 61 μm civarında, orta molekül ağırlıklı PCL (Mn 60000) polimeri ile hazırlanan mikrokürelerde yaklaşık olarak 76 μm ve yüksek molekül ağırlıklı PCL (Mn 70000-80000) ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarında ortalama 125 μm olarak ölçüldüğü görülmektedir.

Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda, hazırlanan mikrokürelerin VA yüklü ve boş formlarının partikül büyüklükleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ($p>0,05$). Ayrıca, aynı molekül ağırlıklı PCL polimerleri ile hazırlanan mikroküre boyutlarında, iç faz PVA oranlarının değişmesi ile anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$); PCL molekül ağırlığı arttıkça elde edilen mikrokürelerin partikül büyüklüklerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p<0,05$) fark elde edildiği görülmüştür.

Sterilizasyon öncesi ve sonrası mikrokürelerin partikül büyüklükleri incelendiğinde, sterilizasyonun partikül büyüklüğü değerleri üzerinde tüm formülasyonlar için istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Bkz. Tablo 4.8.).

Literatürde, bulgularımıza benzer olarak, mikrokürelerin 25 kGy dozla sterilizasyonu sonrası partikül boyutları incelendiğinde partikül boyutlarının sterilizasyondan etkilenmediği bildirilmiştir (160,165) .

5.3.3.3. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelere Yüklenen Antibiyotik Miktarının Belirlenmesi

Bölüm 3.2.3.4.3.4.'te anlatıldığı şekilde tespit edilmiştir. Tablo 4.9.'da görüldüğü gibi, mikroküre formülasyonlarında kullanılan PCL polimerinin molekül ağırlığının artışı ile iç faza yüklenen VA miktarı da istatistiksel olarak anlamlı miktarda artmaktadır ($p<0,05$). Bu artışın nedeninin, PCL polimerinin molekül ağırlığındaki artış ile artan partikül büyüklüğüne bağlı olduğu düşünülebilir. İç faz PVA oranlarındaki artışın da, aynı polimer ağırlığına sahip PCL polimerleri ile hazırlanan mikroküre formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerinde bir artışa neden olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür .

Sterilizasyon öncesi ve sonrası mikrokürelerin enkapsülasyon etkinlikleri karşılaştırıldığında, sterilizasyonun enkapsülasyon etkinliğinde tüm formülasyonlar için istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden olmadığı görülmüştür (Bkz. Tablo 4.9.) ($p>0,05$).

Literatür bulgularına göre, mikrokürelerin 25 kGy dozla sterilizasyonu sonrası VA yükleme etkinlikleri sterilizasyondan etkilenmemektedir (166) . Sonuç olarak düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerin VA yükleme etkinlikleri 25 kGy dozla sterilizasyondan etkilenmemiştir.

5.3.3.4. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin İncelenmesi

Sterilizasyon sonrası, gamma radyasyon ile sterilizasyonun PCL mikrokürelerinin yapısına olası olumsuz etkilerinin incelenmesi amacı ile F8 formülasyon kodlu mikrokürelerin FT-IR spektrumları ve DSC termogramları çekilmiş ve incelenmiştir.

5.3.3.4.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Sterilizasyon sonrası F8 formülasyon kodlu mikrokürelerin FT-IR spektrumları Bölüm 3.2.3.4.3.1.1.'de anlatıldığı şekilde çekilmiş ve sterilizasyon öncesi FT-IR spektrumu ile karşılaştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.15.). Spektrumlar incelendiğinde 25 kGy dozda gamma radyasyon ile sterilizasyonun mikrokürelerin FT-IR spektrumlarında herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görülmektedir. Sterilizasyon sonrası FT-IR spektrumu literatür ile uyumludur (132) .

5.3.3.4.2. DSC Analizi

Sterilizasyon sonrası F8 formülasyon kodlu mikrokürelerin DSC termogramı Bölüm 3.2.3.4.3.1.2.'de anlatıldığı şekilde çekilmiş ve sterilizasyon öncesi DSC termogramı ile karşılaştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.16.). Termogramlar incelendiğinde 25 kGy dozda gamma radyasyon ile sterilizasyonun mikrokürelerin erime derecesi değerlerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı görülmektedir. Sterilizasyon sonrası DSC termogramı literatür ile uyumludur (132) .

5.3.3.5. Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerden *İn Vitro* Salım Deneyleri

Sterilizasyon sonrası mikrokürelerden salım deneyleri Bölüm 3.2.3.4.3.5.'te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. *In vitro* koşullarda steril mikrokürelerden VA salım profili Şekil 4.26.'daki gibidir.

25 kGy gama radyasyon ile sterilize edilen düşük molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan mikrokürelere yüklenen VA'nın, tamamına yakını bir gün içerisinde salınırken, orta molekül ağırlıklı polimerler ile hazırlanan mikrokürelere ise VA salımı 20 gün boyunca devam etmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı PCL polimeri ile hazırlanan mikrokürelere ise VA salımı 50 gün boyunca sürmüştür.

Düşük molekül ağırlıklı PCL (Mw 14000) iç fazında %0,05 oranında PVA içeren 12. saat sonunda mikrokürelere yüklenmiş olan VA'nın %62,7'si, 24. saat sonunda ise %72,3'ü salınmıştır. İç fazında %0,1 oranında PVA içeren aynı molekül ağırlıklı mikrokürelere ise, benzer olarak 12. saat sonunda VA'nın %63,1'i, 24. Saat sonunda ise %73,3'ü salınmıştır (Bkz. Şekil 4.26.).

Orta molekül ağırlıklı PCL (Mn 60.000) mikrokürelere bakıldığında, 2. gün sonunda iç fazında %0,05 oranında PVA içeren formülasyona yüklenen VA'nın %50,5'inin, iç fazında %0,1 oranında PVA içeren formülasyona yüklenen VA'nın ise %53,5'inin salındığı görülmüştür. 20. gün sonunda ise iç fazında %0,1 oranında PVA içeren mikrokürelere VA'nın %100'ü, iç fazında %0,05 PVA içeren mikrokürelere ise %96,8i salınmıştır (Bkz. Şekil 4.26.).

Yüksek molekül ağırlıklı PCL (Mn 70.000-90.000) mikrokürelere ise, 25. gün sonunda iç fazında %0,05 oranında PVA içeren formülasyona yüklenen VA'nın %44,5'inin, iç fazında %0,1 oranında PVA içeren formülasyona yüklenen VA'nın ise %45,8'inin salındığı görülmüştür. 50. gün sonunda ise iç fazında %0,1 oranında PVA içeren mikrokürelere VA'nın %64'ü, iç fazında %0,05 PVA içeren mikrokürelere ise %61,8i salınmıştır (Bkz. Şekil 4.26.).

Sterilizasyon öncesi ve sterilizasyon sonrası VA yüklü mikrokürelere salım profilleri karşılaştırıldığında, sterilizasyonun mikrokürelere salım profillerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Bkz. Şekil 4.26.).

Literatürde gama radyasyon ile sterilizasyonun etkin maddenin mikrokürelere salımı üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda, salımın azaldığı, arttığı (167) veya değişmediği (166) çalışmalara rastlanabilmektedir. Bizim tez çalışmamızda da yine literatürde yer aldığı üzere gama radyasyon öncesi ve sonrası in vitro etkin madde salım profillerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle gamma radyasyon ile sterilizasyon yönteminin ve

uygulanan dozun mikroküre formülasyonlarımızın sterilizasyonu için uygun olduğu görülmektedir.

5.3.3.6.Sterilizasyon Sonrası PCL Mikrokürelerinden Salınan Vankomisin Hidroklorürün Kimyasal Stabilitesinin HPLC Yöntemi İle İncelenmesi

Sterilizasyonun hazırlanan mikroküre formülasyonlarından salınan VA'nın kimyasal stabilitesi üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla elde edilen salım numuneleri üzerinde kalitatif ve kantitatif olarak HPLC analizi yapılmıştır. Salım numunelerinden elde edilen HPLC kromatogramları ve pik alanları saf maddeye ait kromatogramlar ve pik alanları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Kromatogramlar alıkonma zamanı açısından değerlendirildiğinde salım sonrası elde edilen piklerin Vankomisin HCl'ün saf olarak uygulandığı alıkonma zamanı ile aynı zamanda geldiği ve herhangi bir bozunma pikinin bulunmadığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.27., 4.28.).

Literatürde vankomisin hidroklorürün sterilizasyonu amacı ile gama radyasyon ile sterilizasyon yönteminin kullanıldığı görülmektedir (168) . Sterilizasyon öncesi saf VA'nın HPLC ile analizinde verdiği pik zamanı ile steril mikrokürelerden salınan VA'nın verdiği pik zamanının aynı olması, herhangi bir bozunma pikinin bulunmaması, 25 kGy gama radyasyon ile sterilize edilen VA'nın kimyasal stabilitesini koruduğunu göstermektedir. Sonuç olarak 25 kGy gamma radyasyon ile sterilizasyonun VA için uygun bir sterilizasyon yöntemi olduğu sonucuna ulaşılabilir.

5.4. İlaç İçeren Termosensitif Hidrojellerin Hazırlanması ve İlaç Yüklü Jel Formülasyonları Üzerinde Sterilizasyon Öncesi ve Sonrası Karakterizasyon Çalışmaları

5.4.1. İlaç İçeren Steril Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Ortopedik olarak kullanılacak olan implantların sterilize edilmeleri ve steril koşullar altında implante edilmeleri gerekmektedir (155-157) . Bu nedenle, boş ve VA yüklü PCL mikroküreler, USP 36'da belirtildiği gibi 2,5 megarad (Mrad) dozda gamma radyasyon ile sterilize edilmiş ve sterilizasyon öncesi ve sonrası in vitro karakterizasyon çalışmaları yapılarak sterilizasyon yönteminin uygun olduğu gösterilmiştir.

Literatürde pluronik ve kitosan bazlı termosensitif jellerin sterilizasyonu için 121 °C'de otoklav sterilizasyonu kullanılmıştır (12,169-172) . Pluronik ve kitosan termosensitif jellerin de otoklav sterilizasyonu sonrası reolojik özellikleri, sterilizasyon öncesi ve sonrası bulgular karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. İlaç yüklü steril jeller, VA, SP ve steril mikroküreler ile steril jellerin steril koşullar altında karıştırılması ile hazırlanmıştır.

5.4.2. Jelleşme Sıcaklığının Tespit Edilmesi ve Viskozitenin Değerlendirilmesi

Deneyler, Bölüm 3.2.3.5.2.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Makromoleküller etkin maddelerin taşınması ve doku bariyerlerinin aşılmasında *in situ* hidrojel oluşumu, hidrojellerin kullanımını çok daha elverişli kılmaktadır. Termosensitif jellerde sol fazı akışkan sıvı olarak tanımlanırken, jel fazı deneysel bir zaman ölçeği boyunca bütünlüğünü koruyan akmayan yapıdadır (80) . Termosensitif jellerin sol-jel geçiş sıcaklığının tespiti, akışkan sıvı halde iken vücuda enjeksiyon ile hedef bölgeye uygulamanın yapılabilmesi, ardından sistemin uygulandığı bölgede vucüt sıcaklığının etkisi ile jel haline dönüşümünün sağlandığının gösterilmesi açısından önem taşımaktadır. (173,174) . Sterilizasyon öncesi pluronik jellerde sol-jel geçiş sıcaklığı 22°C, kitosan jellerde ise 41°C olarak tespit edilmiştir (n=3). Otoklav

sterilizasyonu sonrası pluronik jellerin sol-jel geçiş sıcaklığı 21°C olarak bulunurken, kitosan jellerin sol-jel geçiş özelliklerinin bozulduğu tespit edilmiştir. Lenarts ve diğerlerinin (175) . Pluronikin sulu çözeltileri (%15-30) ile 15-35 °C arasında yaptıkları reolojik çalışmalarda, pluronik konsantrasyonuna bağlı olarak, sıcaklık ile viskozite arasında üssel bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu olay, sulu çözeltideki pluronik misellerinin sıcaklık ile indüklenen şişme ve çökme ile açıklanmıştır.

Sol-jel geçiş sıcaklığının tespitinden sonra, jeller üzerinde 37 °C'de reolojik ölçümler yapılmıştır. Reolojik ölçümler, sterilizasyon öncesi boş kitosan ve pluronik jel ile sterilizasyon sonrası boş kitosan jel ile, boş, sadece serratopeptidaz içeren, sadece antibiyotik içeren ve serratopeptidaz-antibiyotik ve antibiyotik yüklü PCL mikrokürelerini içeren pluronik hidrojeller üzerinde yapılmıştır. Steril kitosan jel ölçümlerinde, cihazın %Tork (sıvının rotasyonel harekete karşı direnç değeri) değerlerinin uygun aralıklarda (% 10-90) çıkamaması nedeni ile anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

Güç kanunu modeli (power-law) maddelerin reolojik özelliklerini açıklamak için kullanılan iki parametrelili bir modeldir. Bu modelde, power indeks değeri (n) 1 ($n=1$) ise, akış tipi Newtonian, 1'den küçük ise ($n<1$) psödoplastik, 1'den büyükse ($n>1$) dilatant akıştır. Bu model, polimer akışkanların dinamiğini açıklamada en çok kullanılan metottur. Psödoplastik akışkanlarda, viskozite kayma hızının bir fonksiyonudur ve kayma hızı arttıkça viskozite azalır (176) .

Pluronik jel formülasyonunun reolojik özellikleri ile hesaplanan power index değeri 1'den küçük bulunmuştur, bu nedenle akış tipi pseudoplastik akıştır. Pseudoplastik akış gösteren sistemlerde kayma hızı arttıkça viskozite azalmaktadır. Sterilizasyon öncesi pluronik jel formülasyonunun reolojik özellikleri, reometre cihazının ölçümü sonucu % 95,7 güven aralığında Power Law'a uymaktadır (Bkz. Şekil 4.30.). Sterilizasyon sonrası pluronik jelin reolojik özellikleri incelendiğinde, power indeks değerlerine göre pseudoplastik akış gösterdiği ve %96,6 güven aralığında Power Law'a uyduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.31.). Otoklav sterilizasyonu, pluronik jelin reolojik özellikleri üzerinde anlamlı bir farka neden olmamıştır ($p>0,05$). SP ilavesi sonrası steril pluronik jelin reolojik özellikleri incelendiğinde, power indeks değerlerine göre pseudoplastik akış gösterdiği ve %93,3 güven aralığında Power Law'a uyduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.32.). VA

ilavesi sonrası pluronik jelin reolojik özellikleri incelendiğinde, power indeks değerlerine göre pseudoplastik akış gösterdiği ve %95,7 güven aralığında Power Law'a uyduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.33.). VA, SP ve VA yüklü mikroküre ile hazırlanan steril pluronik jelin reolojik özellikleri incelendiğinde ise power indeks değerlerine göre pseudoplastik akış gösterdiği ve %97,9 güven aralığında Power Law'a uyduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.34.). Kayma hızı değerlerine karşı viskozite değerlerinin grafiğe geçirildiği şekiller incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.30. - 4.34.) kayma hızındaki artışla viskozitenin azaldığı görülmektedir. Kayma hızının artması ile viskozitenin azalması da hazırlanan pluronik jel formülasyonlarının psödoplastik akış özelliğine sahip olduğunu göstermektedir.

Sterilizasyon öncesi kitosan jel formülasyonunun reolojik özellikleri incelendiğinde, hesaplanan power index değeri 1'den küçük bulunmuştur, bu nedenle akış tipi pseudoplastik akıştır (Bkz. Şekil 4.29.). Kitosan jelin reolojik özelliklerinin %73,3 güven aralığında Power Law'a uyduğu görülmektedir. Sterilizasyon sonrası kitosan jelin reolojik ölçüm denemeleri yapılmış, ancak viskozitesi çok düşük olduğundan ölçüm için gerekli %Tork değerleri sağlanamamış ve ölçüm yapılamamıştır. Bu da otoklav sterilizasyonu sonrası kitosan jelin viskozitesinin anlamlı derecede azaldığını göstermektedir ($p < 0,05$).

5.4.2.1. İlaç Yüklü Steril Jel Formülasyonundan *In Vitro* Salım Deneyleri ve Validasyonu

İlaç yüklü steril jel formülasyonlarından *in vitro* salım çalışmaları Bölüm 3.2.3.5.3.'te anlatıldığı şekilde "Diyaliz Torbası Yöntemi" kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Salım deneylerine, ilaç yüklü steril jel formülasyonlarından salınan VA, salım örneklerinden HPLC analizi ile saptanamaz düzeye gelene kadar devam edilmiştir.

İlaç yüklü jel formülasyonları ile yapılan ön çalışmalarda, jel formülasyonlarındaki SP dozuna, periyodontit tedavisi amacı ile Maheshwari ve diğerlerinin yaptığı çalışmada (85) geliştirdikleri tetrasiklin ve SP içeren jel formülasyonunda ve Priyanka ve Meenakshi'nin yapmış olduğu çalışmada (177) . seknidazol ve SP içeren jel formülasyonlarında seçtikleri SP konsantrasyonu değeri

(%0,5 a/a) denenerak başlanmıştır. VA dozu için ise Muhl ve diğerleri (178) , Joosten ve diğerleri (179) , ve Tang ve diğerlerinin (180) yaptığı çalışmalarda seçtikleri VA konsantrasyonları ve salınan VA miktarları göz önüne alınarak birim jel içerisinde (0,5 mL) 16 mg olacak şekilde seçilmiştir. Yapılan *in vitro* salım çalışmaları ve mikrobiyolojik çalışmalar ile seçilen SP ve VA konsantrasyonlarının uygunluğu değerlendirilmiş ve dozlarda değişikliğe gidilmiştir.

Jeller ile yapılan salım çalışmalarının ön denemelerinde, kitosan ve pluronik jellerin aynı hacimleri içerisinde (0,5 mL jel) aynı miktarda VA (16 mg), SP (2,5 mg) ve VA yüklü mikroküre (iç fazında %0,1 oranında PVA içeren; 100 mg) içeren formülasyonları kullanılmış, elde edilen sonuçlar değerlendirilerek jel tipine karar verilmiştir. Jellerden VA salım profilleri Şekil 4.35.'te görülmektedir.

Kitosan formülasyonları değerlendirildiğinde, VA yüklü mikroküre olarak düşük molekül ağırlıklı mikroküre içeren jel formülasyonunda (JK1), jeldeki total VA'nın %63,7'si 3. saat sonunda salınırken, ikinci gün sonunda %90,1'i salınmıştır. Orta molekül ağırlıklı mikroküre içeren kitosan jel formülasyonunda (JK2) ise jeldeki total VA'nın %62,6'sı 3. saat sonunda salınırken, ikinci gün sonunda %89,9'u salınmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı mikroküre içeren kitosan jel formülasyonunda (JK3) ise 3. saat sonunda jeldeki total VA'nın %69,2'si salınırken, ikinci gün sonunda %93,1'i salınmıştır.

Kitosan jel formülasyonlarına yüklenmiş olan VA'nın bu hızlı salımının nedeninin, sterilizasyon sonrası kitosan jel formülasyonunun viskozitesindeki azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Her üç molekül ağırlığındaki PCL ile hazırlanan mikroküreleri içeren jel formülasyonlarından VA salım profilleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Pluronik jel formülasyonlarından VA salım profilleri incelendiğinde, VA yüklü mikroküre olarak düşük molekül ağırlıklı mikroküre içeren jel formülasyonunda (JP1), jeldeki total VA'nın %48,9'u 3. saat sonunda salınırken, birinci gün sonunda %66,3'ü, altıncı gün sonunda %67,2'si salınmıştır. Orta molekül ağırlıklı mikroküre içeren pluronik jel formülasyonunda (JP2), 3. saat sonunda jeldeki total VA'nın %58,8'i salınırken, birinci gün sonunda %77,3'ü, altıncı gün sonunda ise %78,1'i salınmıştır. Yüksek molekül ağırlıklı mikroküre içeren pluronik

jel formülasyonunda (JP3) ise 3. saat sonunda jeldeki total VA'nın %75,7'si salınırken, birinci gün sonunda %83,8'i, altıncı gün sonunda ise %85,3'ü salınmıştır.

Pluronik jel formülasyonlarında birinci gün içerisinde görülen hızlı VA salımının, jel içerisine dağıtılmış haldeki serbest VA'nın patlama etkisi ile salımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Biyofilm oluşmuş bölgeye enjekte edilerek uygulanması planlanan ilaç içeren steril jel formülasyonlarından başlangıçta hızlı ve yüksek konsantrasyonda VA salımı, oluşmuş olan biyofilm yapısının hızla kırılabilmesi için istenen bir özelliktir.

Pluronik jel formülasyonlarından VA salım profilleri incelendiğinde, yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikroküreleri içeren formülasyonlardan VA salım hızının daha yüksek olduğu, salım hızının PCL molekül ağırlığı düştükçe yavaşladığı görülmektedir. Salım profillerindeki bu farkın, PCL molekül ağırlığındaki azalma ile mikrokürelerin partikül boyutunun küçülmesi, partikül boyutundaki küçülmenin de mikrokürelerin küme dansitesini azaltması nedeni ile aynı kütledeki mikrokürelerin düşük molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikrokürelerde daha büyük hacme sahip olması, bunun da jel içerisindeki katı hacminin artması sonucu serbest haldeki VA'nın salımını yavaşlatmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Kitosan ve pluronik jel formülasyonlarından VA salım profilleri karşılaştırıldığında, pluronik jel formülasyonlarından VA salımının daha yavaş ve kontrollü bir profil ile gerçekleştiği görülmektedir. Bunun nedeni, pluronik jel formülasyonlarının daha yüksek viskoziteye sahip olmalarıdır.

Ön denemeler sonucu ilaç yüklü steril pluronik jelden VA salımının daha uzun süre ve daha stabil bir profil sergilediği görülmüş ve ilaç yüklü jel çalışmalarına pluronik jel bazlı formülasyonlar ile devam edilmiştir. PCL mikroküre formülasyonlarından ise, daha yüksek VA enkapsülasyon etkinliği ve uzun süreli salım profili nedeni ile PCL Mn 70000-90000 polimeri ile hazırlanan iç fazında %0,1 oranında PVA içeren mikroküre formülasyonları ile devam edilmiştir.

Veyries ve diğerleri (181) , adhere kalan stafilokokların antimikrobiyal duyarlılıkları üzerindeki değişiklikler ile Pluronic F127'nin antiadeziv etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalar sonucu, bakteriyel adezyonun anlamlı oranda azaldığı (%77'den %99,9'a), kalan adhere stafilokokların da antibiyotik aktivitesine daha

duyarlı hale geldikleri, bu nedenle, Pluronic F127 ile antibiyotik kombinasyonunun yabancı malzeme yüzeyinde enfeksiyon gelişimini engellemede umut verici bir yaklaşım olduğu belirtilmiştir. Bu bulgular göz önüne alındığında, deneysel çalışmalarımız sonucu seçtiğimiz pluronik jel formülasyonunun, implant yüzeyinde gelişen stafilocok kaynaklı biyofilm bazlı enfeksiyonun önlenmesinde de umut verici olacağı düşünülmektedir.

Pluronik jel formülasyonu kullanılarak devam edilmesine karar verilen *in vitro* salım çalışmalarında, mikrobiyolojik bulgular değerlendirildiğinde SP içeren ve SP içermeyen jel formülasyonlarından salınan salım örneklerinin antibiyofilm aktiviteleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır, bu nedenle SP dozunun iki katına çıkarılmasına karar verilmiş ve 0,5 mL steril pluronik jel içerisinde sabit miktarlarda VA (16 mg) ve SP (5 mg) ve değişen miktarlarda VA yüklü mikroküre içeren (500 mg – JP6, 300 mg – JP5, 250 mg – JP4) jel formülasyonları hazırlanmış ve salım çalışmaları yapılmıştır. Aynı formülasyonların SP içermeyenleri ile de, SP aktivitesinin gösterilmesi amacı ile salım çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan pluronik jellerden VA salım profilleri Şekil 4.36.'da görüldüğü gibidir.

Yüksek molekül ağırlıklı PCL mikroküreler ile hazırlanan pluronik jel formülasyonundan 500 mg mikroküre içeren formülasyonda birinci gün sonunda total VA'nın %56,7'si salınırken, 300 mg mikroküre içeren jel formülasyondan VA'nın %79,5'i, 250 mg mikroküre içeren jel formülasyondan ise VA'nın %86,6'sı salınmıştır. 500 mg mikroküre içeren formülasyonda on beşinci gün sonunda total VA'nın %77,6'sı salınırken, 300 mg mikroküre içeren jel formülasyondan altıncı gün sonunda VA'nın %89,2'si, 250 mg mikroküre içeren jel formülasyondan altıncı gün sonunda VA'nın %89,2'si üçüncü gün sonunda %91,6'sı salınmıştır.

Jel formülasyonlarından salım profilleri incelendiğinde, yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikroküre miktarı arttıkça VA salımının yavaşladığı görülmektedir. Bunun nedeni, jel içerisindeki katı kütledeki artışa bağlı olarak jel içerisinde serbest halde bulunan VA'nın salımının yavaşlamasıdır. Salım profilindeki bu yavaşlama daha kontrollü bir VA salımını sağlamıştır; ancak, mikroküre kütledeki artış ile jel formülasyonunun enjekte edilebilirlik özelliği azalmıştır.

İleri formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde salım profillerinin uygunluğu ve enjekte edilebilir özellikte

olmaları nedeni ile yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan 200 mg ve 100 mg VA yüklü mikroküre, 16 mg VA ve 5 mg SP içeren jel formülasyonlarının in vivo deneyler için ümit vaat ettiği düşünülerek antibiyofilm aktivitesi deneylerine alınmışlardır.

5.4.2.2. *İn Vitro* Salım Deneyleri Sonrasında Serratiopeptidazın Aktivitesinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.5.3.2.'de anlatıldığı şekilde salım örneklerindeki SP'nin aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Pluronik jel ve düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı PCL mikroküreleri ile hazırlanan jel formülasyonlarından salım örnekleri ile yapılan SP aktivitesi deneylerinde, 2,5 mg total SP içeren JP1 formülasyonunda 2 gün, JP2 formülasyonunda 1 gün, JP3 formülasyonunda 2 gün; yüksek molekül ağırlıklı PCL mikroküreleri ile hazırlanan ve 5 mg total SP içeren JP4 formülasyonunda 4 gün, JP5 ve JP6 formülasyonlarında ise 6 gün boyunca ölçülebilen SP aktivitesi değerleri tespit edilmiştir. Ölçüm sonuçları, SP içermeyen jel formülasyonlarından elde edilen salım örneklerinin kör olarak kullanılması ile hesaplanmıştır.

Jel formülasyonlarından salınan SP aktivitesi incelendiğinde, SP aktivitesinin zamanla azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni, zaman içerisinde jel formülasyonundan salınan SP miktarının azalmasıdır. Yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan mikroküreleri içeren pluronik jel formülasyonları incelendiğinde, mikroküre ağırlığındaki artış ile aktivite süresinde uzama olduğu görülmüştür, bu da mikroküre ağırlığındaki artış ile jel içerisindeki katı madde kütlesinin artması ile SP salımının yavaşlamasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak, salım numunelerinde 6 güne kadar SP aktivitesi gösterilebilmiştir, daha uzun süre gösterilememe sebebinin salım ortamının her gün tazelenmesine bağlı olarak SP miktarının seyrelmesine bağlı olduğu düşünülmektedir.

5.4.2.3. Hazırlanan Steril Preparatların *İn Vitro* Anti-biyofilm Aktivitesinin İncelenmesi

5.4.2.3.1. *İn vitro* Ortamda Biyofilm Oluşturulması

İn vivo hayvan deneylerinde, medikal cihaz uygulamalarına bağlı olarak gelişen biyofilm bazlı osteomyelit modelinin geliştirilebilmesi amacı ile tavşanlara biyofilm kaplanmış implant yerleştirilmesi planlanmıştır. Bu modelin oluşturulabilmesi için, öncelikle *in vitro* koşullarda biyofilm oluşturulmalı, biyofilm oluşumu SEM analizi ile kanıtlanmalı, sonrasında biyofilm üzerinde hayvan modelinde kullanılmak üzere antibiyofilm aktivitesi en yüksek formülasyonun seçilebilmesi amacı ile antibiyofilm aktivite çalışmaları yapılmalıdır. Bu nedenle, *in vitro* koşullarda biyofilm yapısının oluşturulması ve bu yapının formülasyonlarımız ile kırılabilirdiğinin gösterilmesi büyük önem taşımaktadır.

İn vitro ortamda biyofilm oluşturulması ve antibiyofilm aktivitesinin değerlendirilmesi amacı ile başlangıçta Singh ve diğ. (182) tarafından geliştirilen yöntemle hazırlanmıştır. Bunun için *Staphylococcus epidermidis* kalite kontrol suşunun siyah polikarbonat membranlar üzerinde biyofilm oluşturması sağlanmıştır. Bu bakteriler, triptik soy broth sıvı besiyerinde 37 °C’de, orbital çalkalayıcı kullanılarak, bir gece inkübe edilmiş ve bu süre sonunda aynı besiyeri ile dilüe edilmiştir. Daha sonra 600 nm’de optik dansite (OD) değeri 0.05 olacak şekilde PBS ile konsantrasyon ayarlaması yapılmıştır. Kültür edilmiş bu bakterilerden triptik soy agar plaklarına yerleştirilmiş, siyah, polikarbonat membranlara (13 mm çapında ve 0.4 µm por çapına sahip) 10’ar µL’lik ekimler yapılmıştır. Bu membranlar her 24 saatte bir taze plağa aktarılarak 37 °C’de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Oluşan biyofilm tabakasının hücre sayısı, fosfat tamponu ile 180 rpm’de 1 dakika ajite edilerek serbest hücreler uzaklaştırıldıktan sonra, damla plak yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (183) . Biyofilm tabakasının oluşumu SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) kullanılarak teyit edilmiştir. Biyofilm, *S. epidermidis* ekilmiş Mueller-Hinton agar (MHA) katı besiyerine aktarılmıştır. Biyofilm tabakasının üzerine nitroselülöz yapıda bir diğer membran (6 mm çapına ve 0.4 µm por çapına sahip) konulmuş ve en üste antibiyotik-serratiopeptidaz ve antibiyotik yüklenmiş PCL

mikrokürelere içeren jel formülasyonları veya sadece serratiopeptidaz içeren jel formülasyonları yerleştirilmiştir (184) . Kontrol olarak biyofilm tabakası taşımayan steril membranlar kullanılmıştır. Kontrol grubunun MHA’da oluşturduğu üreme inhibisyon zonu %100 penetrasyon değeri olarak alınacak ve antibiyotik penetrasyonunun ve anti-biyofilm aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Ancak; yapılan çalışmalar sonucu, formülasyonların antibiyofilm aktivitesi bu yöntem ile gösterilememiştir. Bunun nedeninin, enzim yapıda bir madde olan SP’nin aktivitesini göstermesi için sulu ortamda bulunmasının gerekliliği olduğu, bu yöntem ile antibiyofilm aktivitesinin gösterilmesi sırasında formülasyonların uygulanmasını takiben kısa bir süre sonra içeriklerindeki suyun buharlaşmasının SP’nin aktivitesini göstermesine engel olmuş olabileceği düşünülmektedir.

Bölüm 3.2.3.6.1.’de anlatıldığı gibi mikrotitrasyon plaklarında oluşturulan biyofilmler, Serratiopeptidaz içeren pH 7,4 PBS çözeltisi ile kontrol grubu olarak sadece pH 7,4 PBS tampon çözeltisinin uygulanmış biyofilm içeren kuyucukların SEM (Nova Nanosem 430) görüntüleri çekilmiş ve serratiopeptidazın biyofilmi parçaladığı Şekil 4.38.’de gösterilmiştir.

Yöntemin uygulanabilirliğinin gösterilmesi amacı ile farklı konsantrasyonlarda serratiopeptidaz ve vankomisin HCl içeren PBS pH 7,4 çözeltileri ile ön denemeler yapılmıştır. VA’nın MİK değerinde, ve bu değer üstünde ve altında olmak üzere üç farklı VA konsantrasyonu belirlenmiştir. Daha sonra, antibiyofilm aktivitesinin gözlemlendiği 256 ug/mL konsantrasyonda VA içeren formülasyona eklenecek olan SP konsantrasyonunun belirlenmesi amacı ile VA’nın 10, 25 ve 50 katı konsantrasyonlarda SP içerecek şekilde çözeltiler ile tekrar denemeler yapılmıştır. SP ve VA içeren PBS pH 7,4 çözeltileri ile muamele sonrasında biyofilmi oluşturan *S. epidermidis* bakterilerinin sayılarını belirlemek amacıyla kuyucuklardan alınan bakteri süspansiyonları TSA besiyeri içeren plaklara ekilmiştir. Ekim sonrası oluşan koloniler sayılarak karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.38. A) incelendiğinde, SP uygulanmamış kuyucuklarda bakterileri bir arada tutan katmanlı biyofilm yapısı rahatlıkla görülmektedir. Şekil 4.38. B) incelendiğinde, SP içeren PBS uygulaması sonrası (24 saat inkübasyon sonrası) bakterileri bir arada tutan biyofilm yapısının kırıldığı ve bir arada duran grubun küçük gruplara bölüldüğü, bakteriyel enfeksiyonun uygun bir antibiyotik ile

giderilmeye açık hale geldiği görülmektedir. Sonuç olarak serratiopeptidazın antibiyofilm aktivitesi SEM görüntüleri ile kanıtlanmıştır.

Antibakteriyellere ve konak savunmasına karşı direnç gelişimi bakımından biyofilm gelişiminin en tehlikeli özelliği glikokaliks yapısının oluşumudur. Bu durum, postoperatif enfeksiyonların tedavisi için yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine neden olmuştur. Bu yaklaşımlardan biri de, proteolitik enzimler kullanarak antibiyotiklerin bakteriyel biyofilm üzerindeki aktivitelerinin artırılması yönündedir (25) . SP ile yapılan bir başka çalışmada, SP'nin topikal kullanımının yara bölgesine antibiyotik penetrasyonunu önemli ölçüde artırdığı ve enfeksiyon oranını azalttığı belirtilmektedir (177) . Deneysel çalışmalarımız ile elde ettiğimiz, SP uygulanmış biyofilm yapısının SEM görüntüleri de literatür bulgularını destekler niteliktedir(Bkz. Şekil 4.38.).

Tablo 4.18.'de farklı konsantrasyonlarda serratiopeptidaz ve vankomisin HCl içeren PBS pH 7,4 çözeltilerinin içerikleri ve elde edilen deney sonuçları görülmektedir. Her bir çözelti VA'nın farklı konsantrasyonlarına karşı SP içermeyen veya artan miktarlarda SP içerecek şekilde hazırlanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, antibiyofilm aktivitesinin her çözelti tipinde SP içermeyen çözeltiler ile muamele sonucu çok düşük olduğu, SP miktarının yüksek ve orta konsantrasyonlarda (50k ve 200k) kullanıldığı çözeltilerde hemen hemen aynı seviyede antibiyofilm aktivitenin saptandığı, bu konsantrasyonların altında ise (25k ve 10k) aktivitenin giderek azaldığı görülmüştür.

Bununla beraber ön çalışmalar sırasında, VA'nın PBS pH 7,4 çözeltisi gibi bir tampon çözelti içerisinde olmadığı durumlarda, ortamın pH'sını, konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak düşürdüğü, pH'daki bu düşüş ile SP aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Bu nedenle jel formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan pluronik jelin, VA varlığında SP'nin aktivitesini gösterebileceği bir pH değeri olan pH 7'de sabitlenebilmesi amacı ile PBS pH 7,4 tamponu içerisinde hazırlanmasına karar verilmiştir.

Bölüm 5.4.2.1.'de ayrıntılı olarak anlatılan, pluronik jel formülasyonlarından *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde salım profillerinin uygunluğu ve enjekte edilebilir özellikte olmaları nedeni ile yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanan 200 mg ve 100 mg VA yüklü mikroküre, 16 mg

VA ve 5 mg SP içeren jel formülasyonlarının in vivo deneyler için ümit vaat ettiği düşünülerek antibiyofilm aktivitesi deneylerine alınmışlardır. Ancak, antibiyofilm aktivitesi çalışmaları sonucu, bu formülasyonlar ile SP'nin aktivitesini gösteremediği tespit edilmiş ve yapılan araştırmalar sonucu, bu durumun jel formülasyonu içerisindeki asidik özellikteki VA'nın yüksek konsantrasyonu nedeni ile pluronik jelin pH'sını 7,5'ten 4,3'e indirdiği, bunun da optimum aktivite için yüksek pH değerlerine gereksinimi olan SP'nin (optimum pH 8,5-9,5; stabil olduğu pH 5,5-9,5) aktivitesini düşürdüğü anlaşılmıştır. Bu durumun önüne geçilmesi amacı ile serbest VA dozunun azaltılmasına ve SP dozunun artırılmasına karar verilmiştir. pH değerinin tamponlanabilmesi amacı ile, Pluronikin pH 7,4 PBS tamponu içerisinde jeli hazırlanmış ve hazırlanan jelin pH'sı 7,3 olarak ölçülmüştür. Sonrasında, 0,5 mL pluronik jel içerisinde 4mg ve 8 mg VA içerecek şekilde formülasyonlar hazırlanmış ve pH ölçümü yapılmış, sırası ile pH 7,1 ile 6,8 olarak bulunmuştur. 4 mg VA içeren pluronik jelin pH'sının SP'nin aktivitesini gösterebilmesi için daha uygun olacağına karar verilmiş, ancak; optimum pH aralığına çıkılamadığı için SP'nin dozunun da artırılmasına karar verilmiştir. Thaller ve diğerlerinin yaptığı çalışmada (185) SP ilavesi ile vasküler graft enfeksiyonlarında görülen *S.epidermidis* kaynaklı biyofilm yapılı enfeksiyonun tedavisinde VA'nın MİK ve MBK aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Bu literatür bilgisi göz önünde bulundurularak, SP'nin yeterli aktivitesinin sağlanabildiği koşullarda, VA'nın antimikrobiyal aktivitesinin artacağı düşünülürse, VA dozunun azaltılmasının jel formülasyonunun antibiyofilm aktivitesi üzerine olumsuz etkilerinin olmayacağı düşünülmüş ve antibiyofilm aktivitesi çalışmalarında 4 mg VA içeren pluronik jel formülasyonları ile çalışılmıştır.

Bu ön çalışmalar sonucunda, VA ile SP miktarları arasında, VA miktarının jelin pH değerini SP aktivitesini gösterebileceği pH değerinin altına indirmeyecek, aynı zamanda etkin konsantrasyonda salınabilecek miktarda sabitlenmesine, SP miktarının yükseltilmesinin antibiyofilm aktiviteyi artırmada bir değişikliğe neden olmadığına, bu nedenle iki farklı konsantrasyonda SP içeren jel formülasyonları ile denemeler yapılmasına karar verilmiştir.

5.4.2.3.2. İlaç Yüklü Jel Formülasyonlarının Antibiyofilm Aktivitesinin Gösterilmesi

İçerdiği yüksek molekül ağırlıklı PCL %0,1 PVA formülasyonlu Vankomisin HCl yüklü mikroküre miktarları, serbest vankomisin HCl miktarları, serratiopeptidaz miktarları farklı, steril pluronik jel formülasyonları (PBS pH 7,4 tamponu ile hazırlanan) hazırlanarak Bölüm 3.2.3.6.2.'de anlatılan yöntem ile antibiyofilm aktiviteleri denenmiştir. Tablo 4.19.'da görüldüğü gibi serratiopeptidaz içermeyen formülasyon ile muamele edilen biyofilm tabakasından elde edilen koloni sayısı ortalama $1,64 \times 10^7$ (n=9) iken, 25 mg SP içeren formülasyon ile muamele edilen biyofilm tabakasından elde edilen koloni sayısı ortalama $7,7 \times 10^6$ 'ya düşmüştür.

Antibiyofilm aktivitesi en yüksek olan jel formülasyonu 200 mg mikroküre, 25 mg SP, 4 mg VA içeren JP8 formülasyonu olmuştur. Bu nedenle in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere bu formülasyon seçilmiştir.

5.4.2.4. Steril Sonuç Jel Formülasyonunda Kullanılan Enzim-Antibiyotik-Polimerler Arasındaki Olası Etkileşimlerin İncelenmesi

İlaç yüklü steril sonuç jel formülasyonda kullanılan VA, SP ve VA yüklü mikroküre ile pluronik jel arasında olası kimyasal etkileşimlerin varlığını değerlendirmek amacı ile yapısal inceleme için Bölüm 3.2.3.6.3.'te anlatıldığı şekilde DSC analizleri yapılmıştır.

DSC termogramları incelendiğinde, ilaç yüklü steril pluronik jelin DSC termogramında, PCL'ye ait erime piki ve pluronike ait erime piklerinin yer aldığı görülmektedir. Bu durum, jel formülasyonu içerisinde, mikroküre yapısındaki PCL polimeri ile jel yapısındaki pluronik polimeri arasında herhangi bir kimyasal etkileşim olmadığını göstermektedir. İlaç yüklü jel formülasyonunda SP ve VA'ya ait termogramların görülmemesinin nedeni, SP ve VA'nın keskin bir erime pikine sahip olmamasından kaynaklanmaktadır.

5.4.2.5.Sonuç Jel Formülasyonundan *in vitro* Salım Deneyleri

İlaç yüklü steril jel formülasyonları ile yapılan *in vitro* antibiyofilm aktivitesi deneyleri sonucu, antibiyofilm aktivitesi en yüksek bulunan ilaç yüklü steril jel formülasyonu sonuç formülasyon olarak seçilmiş ve bu formülasyonun *in vitro* salım deneyleri yapılmıştır. Buna göre *in vitro* antibiyofilm aktivitesi en yüksek olan jel formülasyonunun, 0,5 mL steril pluronik jel içerisinde 4 mg serbest VA, 25 mg serbest SP ve 200 mg yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanmış VA yüklü mikroküre içeren JP8 formülasyon kodlu jel formülasyonu olduğu yapılan deneyler sonucu görülmüştür.

In vivo çalışmalarda kullanılmak üzere antibiyofilm aktivitesi en yüksek olması nedeni ile seçilen JP8 formülasyonundan *in vitro* salım deneyleri yapılmış ve VA salım profili, salım örneklerindeki SP'nin enzimatik aktivitesi, salım numunelerindeki VA'nın antimikrobiyal aktivitesi ve salım numunelerinin antibiyofilm aktivitesi değerlendirilmiştir.

5.4.2.5.1. Sonuç Jel Formülasyonundan VA Salım Profili

İlaç yüklü steril jel formülasyonlarından *in vitro* salım çalışmaları Bölüm 3.2.3.6.4.'te anlatıldığı şekilde “Diyaliz Torbası Yöntemi” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Salım deneylerine, ilaç yüklü steril jel formülasyonlarından salınan VA, salım örneklerinden HPLC analizi ile saptanamaz düzeye gelene kadar devam edilmiştir.

In vivo çalışmalarda kullanılmak üzere antibiyofilm aktivitesi en yüksek olması nedeni ile seçilen 0,5 mL steril pluronik jel içerisinde 4 mg serbest VA, 25 mg serbest SP ve 200 mg yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanmış VA yüklü mikroküre içeren JP8 formülasyonundan salım çalışmaları yapılmıştır. Aynı formülasyonun SP içermeyenleri ile de, SP aktivitesinin gösterilmesi amacı ile salım çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan pluronik jellerden VA salım profili Şekil 4.41.'de görüldüğü gibidir.

Steril sonuç jel formülasyonundan VA salım profili incelendiğinde, birinci gün sonunda jel formülasyonundaki total VA'nın %67,8'inin, ikinci gün sonunda %69,9'unun, yirmibeşinci gün sonunda ise %74,5'inin salındığı görülmüştür. Jel formülasyonuna yüklü serbest VA'nın büyük bir kısmı birinci gün sonunda hızlı bir salım ile salınmış, birinci gün sonrasında kontrollü bir salım profili ile VA salımı devam etmiştir.

Salım örneklerinden analiz edilen VA'nın, totalde %74,5'inin salınmış olmasına rağmen, 20. gün sonrasında HPLC analizlerinde saptanamaz düzeye düşmesinin nedeni, her örnek alma zamanında salım ortamının tamamının alınıp yerine taze ortam koyulmasından kaynaklanan salım numunesindeki VA'nın seyrelmesidir.

Sonuç olarak, *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen JP8 formülasyon kodlu steril sonuç jel formülasyonundan VA salımı 20 gün boyunca HPLC analizi ile tespit edilebilir düzeylerde olmuş ve bu süre sonunda jele yüklenen total VA'nın %74,5'i salınmıştır. Başlangıçta hızlı bir VA salım profili sağlanmış, bu sayede *in vivo* koşullarda, formülasyonun enjeksiyonunu takiben, kırılması güç biyofilm yapısı içerisindeki bakterilerin yüksek dozda antibiyotik ile karşılaşmasına olanak verecek, sonrasında daha kontrollü bir salım ile bakterilerin tekrar üremesini önleyecek bir VA salım profili elde edilmiştir. *In vitro* antibiyofilm deneylerinde, biyofilm üzerinde yüksek antibiyofilm aktivitesi göstermiş olan JP8 formülasyonu, *in vitro* salım deneyleri sonucu VA salım profili ile de *in vivo* deneyler için umut vaat etmektedir.

5.4.2.5.2. Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan SP'nin *in vitro* Enzimatik Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.3.6.5.'te anlatıldığı şekilde JP8 formülasyon kodlu sonuç jel formülasyonunun salım örneklerindeki SP'nin aktivite ölçümleri yapılmıştır.

0,5 mL steril pluronik jel içerisinde 4 mg serbest VA, 25 mg serbest SP ve 200 mg yüksek molekül ağırlıklı PCL ile hazırlanmış VA yüklü mikroküre içeren jel formülasyonu JP8 formülasyon kodlu sonuç jel formülasyonunda 10 gün boyunca ölçülebilen SP aktivitesi değerleri tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.42.). Ölçüm

sonuçları, SP içermeyen jel formülasyonlarından elde edilen salım örneklerinin kör olarak kullanılması ile hesaplanmıştır. Sonuç jel formülasyonundan % Kümülatif SP salımı değerleri hesaplandığında, birinci gün sonunda formülasyon içerisindeki total SP'nin %41,8'inin hızlı bir salım ile salındığı görülmektedir (Bkz. Şekil 4.43.).

Jel formülasyonlarından salınan SP aktivitesi incelendiğinde, SP aktivitesinin zamanla azaldığı görülmektedir. Bunun nedeni, zaman içerisinde jel formülasyonundan salınan SP miktarının azalması ve her örnek alma zamanında salım ortamının tamamının alınması ve taze ortam koyulması ile salım örneklerinde meydana gelen seyrelmedir. Jel formülasyonu içerisindeki total SP'nin birinci gün sonunda %41,8'inin salınmış olması, SP'nin hızla biyofilm içeren yüzeye salınıp biyofilmi kırması ve bu yol ile VA'nın etkinliğini artırması açısından olumlu bir bulgudur.

Sonuç olarak, salım numunelerinde 10 güne kadar SP aktivitesi gösterilebilmiştir, daha uzun süre gösterilememe sebebinin salım ortamının her gün tazelenmesine bağlı olarak SP miktarının seyrelmesine bağlı olduğu düşünülmektedir.

5.4.2.5.3. Steril Sonuç Jel Formülasyonundan Salınan Salım Örneklerinin *in vitro* Antimikrobiyal ve Antibiyofilm Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Steril sonuç jel formülasyonundan salınan salım örneklerinin *in vitro* antimikrobiyal aktivite deneyleri sonucu elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, salım sonrası salım numunelerindeki VA'nın antimikrobiyal aktivitesini sürdürdüğü gösterilmiştir. Salım numunelerindeki seyrelmeye bağlı olarak salım numunesi içerisindeki VA'nın konsantrasyonundaki düşüğe bağlı olarak antimikrobiyal aktivitesinin birinci günden sonra azaldığı görülmüştür (Bkz. Tablo 4.20.). Bu sonuca paralel olarak salım numunelerindeki VA'nın ve SP'nin antibiyofilm aktivitesinin de birinci günden sonra azaldığı görülmüştür (Bkz. Tablo 4.21.). Antibiyofilm aktivitesi sonuçları aynı zamanda jelden SP salım profili ile de uyum içerisinde bulunmuştur. Jeldeki total SP'nin %41,8'inin birinci gün sonunda salınmış olması, sonrasında çok düşük ve sabit bir salım profili göstermesi antibiyofilm

aktivitesinin birinci günden sonra azalmasını destekleyici özelliktedir (Bkz. Şekil 4.43.).

5.5. *In vivo* Pilot Çalışmalar

In vitro koşullarda antibiyofilm aktivitesi en yüksek bulunan steril jel formülasyonu ile *in vivo* pilot çalışmaların yapılabilmesi amacı ile, 4 adet Yeni Zelanda tipi albino tavşan kullanılarak *in vivo* koşullarda medikal cihaz uygulamalarına bağlı olarak gelişen biyofilm bazlı osteomyelit modeli hazırlanmış ve osteomyelit grubu olarak sadece biyofilm kaplı implant yerleştirilen ve bakteri süspansiyonu enjekte edilen tavşan ile, tedavi grubu olarak biyofilm kaplı implant yerleştirilmesi ve bakteri süspansiyonu enjeksiyonunu takiben tedavi profilini görmek amacı ile ilaç yüklü steril sonuç jel formülasyonu enjekte edilen tavşanlar, osteomyelit gelişimi ve tedavi sürecinin sağlanması amacı ile cerrahi işlem uygulanmasını takiben üçüncü hafta sonunda ötenazi edilmişlerdir. Ötenazi sonrası cerrahi işlem uygulanan bölge açılarak bölgenin fotoğrafı çekilmiş, sonrasında yerleştirilen implantların bir kısmı SEM analizi ile yüzeydeki biyofilm varlığının tespiti amacı ile çıkarılmış, kalan kısım ve implantasyonun gerçekleştiği kemik doku ve çevre doku histolojik değerlendirmenin yapılabilmesi için kesilerek çıkartılmıştır.

Biyofilm kaplı implantın implantasyonu öncesi, yüzeyin biyofilm kaplandığının gösterilmesi amacı ile SEM analizi yapılmıştır. İmplantasyon öncesi biyofilm kaplı implanta ait SEM görüntüleri Şekil 4.45.'deki gibidir. Buna göre implantasyon öncesi, *in vivo* koşullarda medikal cihaz uygulamalarına bağlı olarak gelişen biyofilm bazlı osteomyelit modeli geliştirmek amacı ile biyofilm ile kaplanması amaçlanan implant yüzeylerinin biyofilm ile kaplandığı gösterilmiştir.

5.5.1. Tavşanlara Tedavi Uygulanmasını Takiben Yapılan Değerlendirmeler

Cerrahi işlem uygulamasını takiben üçüncü hafta sonunda tavşanlara ötenazi uygulanmış ve cerrahi müdahalenin yapıldığı bölge açılarak fotoğrafları çekilmiştir. Bölgeye ilişkin görüntüler Şekil 4.46.'daki gibidir. Şekil 4.46.'da görüldüğü gibi

tedavi uygulanmayan osteomyelit grubunda yüksek bir biyofilm oluşumu gözlenirken, tedavi uygulanan tedavi grubunda biyofilm oluşumu çok küçük bir bölge ile sınırlı kalmıştır. İlk görüntüler ile tedavi amacı ile ilaç yüklü steril jel uygulamasının biyofilm oluşumunu azalttığı söylenebilir.

5.5.1.1. Mikrobiyolojik Değerlendirmeler

Tavşanlara cerrahi işlem uygulanmasını takiben üçüncü hafta sonunda tavşanlara ötenazi uygulanmış ve cerrahi işlem gören bölge açılarak implantların bir kısmı çıkarılmış ve Bölüm 3.2.4.3.1.'de anlatılan yöntem ile implantlar altınla kaplanarak SEM görüntüleri alınmıştır. Jel formülasyonunun uygulanmadığı osteomyelit grubundaki tavşandan çıkarılan implanta ait SEM görüntüsü ve jel formülasyonunun uygulandığı tedavi gruplarından çıkarılan implantların SEM görüntüleri Şekil 4.48 ve Şekil 4.49.'da görüldüğü gibi olmuştur. Buna göre, tedavi işlemi uygulanan ve uygulanmayan tavşanlardan çıkarılan implant yüzeylerinde biyofilme rastlanmıştır; ancak, Şekil 4.47. A1, A2 ve A3'te görüldüğü gibi, tedavi uygulanmayan osteomyelit grubundan çıkarılan implant yüzeyinde daha geniş yayımlı ve kırılmamış yapıda bir biyofilm oluşumu gerçekleşirken, tedavi gruplarından çıkarılan implantların yüzey görüntülerinin gösterildiği Şekil 4.48. B1, B2, B3 ve Şekil 4.49. C1, C2, C3 görüntüleri incelendiğinde, bu gruplardan çıkarılan implant yüzeylerinde daha dar yayımlı ve kırılmış seyreltik görüntülü bir biyofilm oluşumu gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak, cerrahi işlem ile tavşanlara yerleştirilen implantların yüzeylerine ait SEM görüntüleri incelendiğinde, tedavi uygulanmayan osteomyelit grubundan çıkarılan implant yüzeyinde geniş yayımlı sağlam biyofilm yapısı görülürken, tedavi gruplarından çıkarılan implant yüzeylerinde kırılmış, seyrelmiş ve daha dar yayımlı biyofilm yapısının görülmesi, tedavi gruplarına uygulanan ilaç yüklü steril jelin biyofilm yapısını kırmada ve bölgedeki enfeksiyonu tedavi etmede etkili olmada başarılı olabileceğine ilişkin umut vaat edebileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Elde edilen bulgular ışığında:

- Bu tez çalışmasında, günümüzde ortopedi alanında klinikte karşılaşılan en büyük problemlerden biri olan biyofilm bazlı medikal cihaz kaynaklı (BBMCK) osteomyelitin tedavisine yönelik vankomisin hidroklorür (VA), serratiopeptidaz (SP) ve VA yüklü mikroküre içeren termosensitif jel formülasyonları hazırlanmıştır.
- Glikopeptid yapısında bir antibiyotik olan VA, düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı polikaprolakton (PCL) mikrokürelerine başarılı bir şekilde yüklenmiş ve yükleme sonrası dayanıklı olduğu gösterilmiştir.
- Mikrokürelerin partikül büyüklüğü, ilaç yükleme etkinliği ve salım özelliklerinin kullanılan PCL'nin molekül ağırlığından etkilendiği tespit edilmiştir.
- Hazırlanan mikroküreler morfolojik özellikleri bakımından incelendiğinde, küresele yakın şekilde oldukları ve partikül büyüklüğü açısından monodispers dağılımda hazırlanabildikleri görülmüştür.
- PCL mikroküreleri, sahip olduğu partikül büyüklükleri nedeni ile (58-134 µm), BBMCK osteomyelitin olduğu bölgeye cerrahi işlem gerekmeksizin direkt enjeksiyon ile uygulanabilir formülasyonlar olarak hazırlanabilmiş, uygun salım özellikleri sayesinde VA'nın 7 hafta boyunca kontrollü salımı sağlanmıştır.
- Gama radyasyon ile sterilizasyonun hazırlanan mikrokürelerin karakterizasyonları üzerine (partikül büyüklüğü, ilaç yükleme etkinliği, salım profili, morfoloji, fizikokimyasal özellikler) herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.
- Serbest VA, VA yüklü mikroküre ve SP'yi dayanıklı bir şekilde içeren pluronik ve kitosan jel formülasyonları hazırlanmış ve jel formülasyonlarının psödoplastik akış gösterdikleri tespit edilmiştir. Otoklav sterilizasyonunun kitosan termosensitif jellerin reolojik özellikleri üzerine olumsuz etkileri olduğu saptanmıştır.

- Jel formülasyonlarından salım çalışmalarında, VA'nın kontrollü bir şekilde salındığı ve pluronik jellerin kitosan jellere göre daha yavaş bir salım profili gösterdiği bulunmuştur.
- İn vitro olarak biyofilm modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuş, biyofilm varlığı ve SP'nin antibiyofilm aktivitesi Taramalı Elektron Mikroskopisi ile gözlenebilmiştir.
- İn vitro olarak oluşturulan biyofilm modeli üzerinde yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda, formülasyonlara ilave edilecek uygun SP dozu tespit edilmiştir.
- VA, SP ve mikroküre içeren pluronik jelden meydana gelen formülasyonların antibiyofilm aktivitesi in vitro olarak oluşturulmuş biyofilm modelinde değerlendirilmiştir. İncelemeler sonucunda, yüksek VA miktarının SP'nin aktivitesini kaybetmesine neden olduğu tespit edildiği için, formülasyondaki uygun antibiyotik-enzim oranı belirlenmiştir.
- Yapılan çalışmalarda, ormülasyonlardan salınan SP'nin enzimatik ve antibiyofilm aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir.
- İn vivo olarak biyofilm bazlı medikal cihaz kaynaklı osteomyelit modeli pilot çalışmalarda Yeni Zelanda tipi albino tavşanlar kullanılarak başarılı bir şekilde oluşturulmuştur.
- Osteomyelit grubundaki tavşandan çıkarılan implantta Taramalı Elektron Mikroskopisi ile yoğun biyofilm yapısı görülürken, tedavi grubundaki tavşanlardan çıkarılan implantta biyofilm yapısının kırıldığı tespit edilmiştir.
- Sonuç olarak in vitro ve in vivo pilot çalışmaları gerçekleştirilen sonuç jel formülasyonunun in vivo koşullarda da in vitro koşullarda gösterdiğine yakın antibiyofilm aktivitesine sahip olduğu, kesin sonuçlara ulaşabilmek için kontrol grubunu da içeren daha fazla sayıda hayvan ile yapılacak in vivo çalışmaların yapılması gerektiği; ancak pilot çalışmalar sonucu seçilen sonuç jel formülasyonunun in vivo koşullarda BBMCK osteomyelitinin tedavisi için umut vaat edici olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sağlık Bakanlığı Tıbbi Cihaz Yönetmeliği. (09.01.2007) *Resmi Gazete*.
2. Rodríguez-González, F.Á. (2009). Biomaterials in Orthopaedic Surgery: ASM International.
3. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. (2004). Biomaterials science: an introduction to materials in medicine: Academic press.
4. <http://www.in.all.biz/orthopedic-implants-g132046>, . Ağ
5. Yue, J.J., Bertagnoli, R., McAfee, P.C., An, H.S. (2008). Motion preservation surgery of the spine: Advanced techniques and controversies: Saunders.
6. Long, P.H. (2008) Medical devices in orthopedic applications. *Toxicologic pathology*, 36 (1), 85-91.
7. Nair, S.P., Meghji, S., Wilson, M., Reddi, K., White, P., Henderson, B. (1996) Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infection and immunity*, 64 (7), 2371-2380.
8. Turner, C.H., Pavalko, F.M. (1998) Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *Journal of orthopaedic science*, 3 (6), 346-355.
9. Yaszemski, M.J., Trantolo, D.J., Lewandrowski, K.U., Hasirci, V., Altobelli, D.E., Wise, D.L. (2004). Biomaterials in orthopedics: M. Dekker.
10. Öztuna, V. Osteomyelit Patofizyolojisi ve Tedavi Prensipleri.
11. Lew, D.P., Waldvogel, F.A. (1997) Osteomyelitis. *New England Journal of Medicine*, 336 (14), 999-1007.
12. "fibula: tibia and fibula, normal and result of disease". Photograph. Encyclopædia Britannica Online. Web. 04 Nov. 2012. <http://www.britannica.com/EBchecked/media/3759/Defect-of-tibia-caused-by-septic-osteomyelitis-in-childhood-with>
13. Brady, R.A., Leid, J.G., Calhoun, J.H., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E. (2007) Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52 (1), 13-22.
14. Trueta, J. (1959) The three types of acute haematogenous osteomyelitis. *J Bone Joint Surg*, 41 (Nov), 671-680.
15. Zuluaga, A.F., Galvis, W., Saldarriaga, J.G., Agudelo, M., Salazar, B.E., Vesga, O. (2006) Etiologic diagnosis of chronic osteomyelitis: a prospective study. *Archives of internal medicine*, 166 (1), 95.

16. Mader, J.T., Ortiz, M., Calhoun, J.H. (1996) Update on the diagnosis and management of osteomyelitis. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, 13 (4), 701.
17. Zimmerli, W., Widmer, A.F., Blatter, M., Frei, R., Ochsner, P.E. (1998) Role of Rifampin for Treatment of Orthopedic Implant-Related Staphylococcal Infections. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 279 (19), 1537-1541.
18. Fodor, L., Ullmann, Y., Soudry, M., Calif, E., Lerner, A. (2006) Prophylactic external fixation and extensive bone debridement for chronic osteomyelitis. *Acta orthopaedica belgica*, 72 (4), 448.
19. Hoang Thi, T., Chai, F., Leprêtre, S., Blanchemain, N., Martel, B., Siepmann, F. ve diğerleri. (2010) Bone implants modified with cyclodextrin: Study of drug release in bulk fluid and into agarose gel. *International journal of pharmaceuticals*, 400 (1), 74-85.
20. Xie, Z., Liu, X., Jia, W., Zhang, C., Huang, W., Wang, J. (2009) Treatment of osteomyelitis and repair of bone defect by degradable bioactive borate glass releasing vancomycin. *Journal of Controlled Release*, 139 (2), 118-126.
21. Yenice, I., Çalış, S., Kaş, H., Özalp, M., Ekizoğlu, M., Hıncal, A. (2002) Biodegradable implantable teicoplanin beads for the treatment of bone infections. *International journal of pharmaceuticals*, 242 (1), 271-275.
22. Yenice, I., Çalış, S., Atilla, B., Kas, H., Özalp, M., Ekizoglu, M. ve diğerleri. (2003) In vitro/in vivo evaluation of the efficiency of teicoplanin-loaded biodegradable microparticles formulated for implantation to infected bone defects. *Journal of microencapsulation*, 20 (6), 705-717.
23. Sayin, B., Çalış, S., Atilla, B., Marangoz, S., Hıncal, A.A. (2006) Implantation of vancomycin microspheres in blend with human/rabbit bone grafts to infected bone defects. *Journal of microencapsulation*, 23 (5), 553-566.
24. Francolini, I., Donelli, G. (2010) Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59 (3), 227-238.
25. Selan, L., Berlutti, F., Passariello, C., Comodi-Ballanti, M., Thaller, M. (1993) Proteolytic enzymes: a new treatment strategy for prosthetic infections? *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37 (12), 2618-2621.
26. Sorrell, T.C., Packham, D.R., Shanker, S., Foldes, M., Munro, R. (1982) Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of internal medicine*, 97 (3), 344.
27. Poulsen, L.V. (1999) Microbial biofilm in food processing. *LWT-Food Science and Technology*, 32 (6), 321-326.

28. Gün, İ. and F.Y. Ekinci, *Biyofilmler: Yüzeylelerdeki Mikrobiyal Yaşam*, 2009, Gıda.
29. Padera, R.F. (2006) Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovascular Pathology*, 15 (5), 264-270.
30. Allison, D.G. (2003) The biofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2), 139-150.
31. Wimpenny, J. (2000). An overview of biofilms as functional communities [Bildiri].SYMPOSIA-SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY.
32. Decho, A.W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*, 20 (10), 1257-1273.
33. Sutherland, I.W. (2001) The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9 (5), 222-227.
34. Costerton, J., Irvin, R., Cheng, K. (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 35 (1), 299-324.
35. Tamilvanan, S., Venkateshan, N., Ludwig, A. (2008) The potential of lipid- and polymer-based drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on device-related nosocomial infections. *Journal of Controlled Release*, 128 (1), 2-22.
36. O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54 (1), 49-79.
37. Cámara, M. (2006) Quorum sensing: a cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioral changes in bacterial populations. *Membrane Computing*, 42-48.
38. Arnold, J., Silvers, S. (2000) Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poultry science*, 79 (8), 1215-1221.
39. Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15 (2), 167-193.
40. Stickler, D. (1996) Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling*, 9 (4), 293-305.
41. Raad, I. (1998) Intravascular-catheter-related infections. *Lancet*, 351 (9106), 893.
42. Smith, A.W. (2005) Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced drug delivery reviews*, 57 (10), 1539-1550.
43. Mecikoglu, M., Saygi, B., Yildirim, Y., Karadag-Saygi, E., Ramadan, S.S., Esemeli, T. (2006) The effect of proteolytic enzyme serratiopeptidase

- in the treatment of experimental implant-related infection. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 88 (6), 1208-1214.
44. Okada, H.,Toguchi, H. (1995) Biodegradable microspheres in drug delivery. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 12 (1), 1.
 45. KAŞ, H.S. (2002). İlaç taşıyıcı mikropartiküler sistemler. A. Z. Gürsoy (Ed.). *Kontrollu Salım Sistemleri* (s. 65-103). İstanbul
 46. Whateley, T.L. (1996) Microcapsules: Preparation by interfacial polymerization and interfacial complexation and their applications. *Drugs and the pharmaceutical sciences*, 73, 349-375.
 47. Varde, N.K.,Pack, D.W. (2004) Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert opinion on biological therapy*, 4 (1), 35-51.
 48. Burton, K., Shameem, M., Thanoo, B.,DeLuca, P. (2000) Extended release peptide delivery systems through the use of PLGA microsphere combinations. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11 (7), 715-729.
 49. Sinha, V., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R.,Trehan, A. (2004) Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International journal of pharmaceutics*, 278 (1), 1-23.
 50. Hakkinen, J.P., Miller, M.W., Smith, A.H.,Knight, D.R. (1995) Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovascular research*, 29 (1), 74-79.
 51. Liu, W., Griffith, M.,Li, F. (2008) Alginate microsphere-collagen composite hydrogel for ocular drug delivery and implantation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19 (11), 3365-3371.
 52. Virto, M.R., Elorza, B., Torrado, S., Elorza, M.L.A.,Frutos, G. (2007) Improvement of gentamicin poly (d, l-lactic- ϵ -glycolic acid) microspheres for treatment of osteomyelitis induced by orthopedic procedures. *Biomaterials*, 28 (5), 877-885.
 53. Biondi, M., Ungaro, F., Quaglia, F.,Netti, P.A. (2008) Controlled drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (2), 229-242.
 54. Rajput, G., Majmudar, F., Patel, J., Thakor, R.,Rajgor, N. (2010) Stomach-specific mucoadhesive microsphere as a controlled drug delivery system. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1 (1), 70.
 55. Edlund, U.,Albertsson, A. (2002) Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. *Degradable aliphatic polyesters*, 67-112.
 56. Yang, C., Plackett, D., Needham, D.,Burt, H.M. (2009) PLGA and PHBV microsphere formulations and solid-state characterization: possible

implications for local delivery of fusidic acid for the treatment and prevention of orthopaedic infections. *Pharmaceutical research*, 26 (7), 1644-1656.

57. Hu, Y., Li, H., Li, S. (2010) Preparation and property of injectable calcium phosphate cement incorporated with rhBMP-2 loaded chitosan microspheres. *Orthopedic Journal of China*, 18 (20), 1723-1726.
58. Maachou, H., Bal, K., Bal, Y., Chagnes, A., Cote, G., Aliouche, D. (2012) In Vitro Biomineralization and Bulk Characterization of Chitosan/Hydroxyapatite Composite Microparticles Prepared by Emulsification Cross-Linking Method: Orthopedic Use. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-17.
59. Stall, A.C., Becker, E., Ludwig, S.C., Gelb, D., Poelstra, K.A. (2009) Reduction of postoperative spinal implant infection using gentamicin microspheres. *Spine*, 34 (5), 479-483.
60. Wang, F., Ni, B., Zhu, Z., Liu, F., Zhu, Y.Z., Liu, J. (2011) Intra-discal vancomycin-loaded PLGA microsphere injection for MRSA discitis: an experimental study. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 131 (1), 111-119.
61. Shirui Mao, C.G., Yi Shi & Luk Chiu Li, <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/17425247.2012.709844>, R.M. (Jul 27 2012) Recent advances in polymeric microspheres for parenteral drug delivery--part 1. *Expert Opin Drug Deliv*, Vol. 9, No. 9 1161-1176.
62. Handbook of Pharmaceutical Excipients, P.J.S. Raymond C Rowe, Marian E Quinn, Editor 2009, Pharmaceutical Press USA.
63. Vasir, J.K., Tambwekar, K., Garg, S. (2003) Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *International journal of pharmaceuticals*, 255 (1), 13-32.
64. Jain, R.A. (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. *Biomaterials*, 21 (23), 2475-2490.
65. Prasanth v.v , A.C.M., Sam T Mathew, Rinku Mathapan. (Apr – Jun 2011) Microspheres - An Overview. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, Vol. 2 (2).
66. Freiberg, S., Zhu, X. (2004) Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceuticals*, 282 (1), 1-18.
67. O'Donnell, P.B., McGinity, J.W. (1997) Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28 (1), 25-42.

68. A. Atilla HINCAL, S.Ç. (2000). Microsphere Preparation by Solvent Evaporation Process. L. D. Wise (Ed.). In: Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology: Marcel Dekker Inc.
69. Hombreiro Pérez, M., Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Astier, A., Hoffman, M. ve diğ erleri. (2000) The preparation and evaluation of poly (ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of controlled release*, 65 (3), 429-438.
70. Ramesh, D.V. (2009) Comparison of Oil-in-Oil, Water-in-Oil-in-Water and Melt Encapsulation Techniques for the Preparation of Controlled Release B12 Poly (ϵ -caprolactone) Microparticles. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 23 (1).
71. Arifin, D.Y., Lee, L.Y., Wang, C.H. (2006) Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 58 (12), 1274-1325.
72. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.6. (1 July 2012).
73. Escobar-Chávez, J., López-Cervantes, M., Naik, A., Kalia, Y., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A. (2006) Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 9 (3), 339-358.
74. Bilensoy, E., Cirpanlı, Y., Ş en, M., Doğan, A.L., Çalış, S. (2007) Thermosensitive mucoadhesive gel formulation loaded with 5-Fu: cyclodextrin complex for HPV-induced cervical cancer. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57 (1), 363-370.
75. Bilensoy, E., Moroy, P., Cirpanlı, Y., Bilensoy, T., Çalış, S., Mollamahmutoglu, L. (2011) A double-blind placebo-controlled study of 5-fluorouracil: cyclodextrin complex loaded thermosensitive gel for the treatment of HPV induced condyloma. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 69 (3), 309-313.
76. PENA, L. (PENA, L). Gel Dosage Forms: Theory, Formulation, and Processing. A. A. W. OSBORNE (Ed.). Topical Drug Delivery Formulations (s. 381,382)
77. Yener, G. (2004). Merhemler, Kremler, Jeller, Patlar. A. Gürsoy (Ed.). Farmasötik Teknoloji – Temel Konular ve Dozaj Ş ekilleri (c. No:2, s. S:287-299). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını
78. Zhou, H.Y., Chen, X.G., Kong, M., Liu, C.S., Cha, D.S., Kennedy, J.F. (2008) Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. *Carbohydrate polymers*, 73 (2), 265-273.

79. Tang, Y.F., Du, Y.M., Hu, X.W., Shi, X.W., Kennedy, J.F. (2007) Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly (vinyl alcohol) blend hydrogel. *Carbohydrate polymers*, 67 (4), 491-499.
80. Jeong, B., Kim, S.W., Bae, Y.H. (2012) Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. *Advanced drug delivery reviews*.
81. Mulik, R., Kulkarni, V., Murthy, R. (2009) Chitosan-based thermosensitive hydrogel containing liposomes for sustained delivery of cytarabine. *Drug development and industrial pharmacy*, 35 (1), 49-56.
82. Kim, S., Nishimoto, S.K., Bumgardner, J.D., Haggard, W.O., Gaber, M.W., Yang, Y. (2010) A chitosan/beta-glycerophosphate thermo-sensitive gel for the delivery of ellagic acid for the treatment of brain cancer. *Biomaterials*, 31 (14), 4157.
83. Kempe, S., Metz, H., Bastrop, M., Hvilsom, A., Contri, R.V., Mäder, K. (2008) Characterization of thermosensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68 (1), 26-33.
84. Choi, H.G., Jung, J.H., Ryu, J.M., Yoon, S.J., Oh, Y.K., Kim, C.K. (1998) Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository. *International journal of pharmaceutics*, 165 (1), 33-44.
85. Maheshwari, M., Miglani, G., Mali, A., Paradkar, A., Yamamura, S., Kadam, S. (2006) Development of tetracycline-serratiopeptidase-containing periodontal gel: formulation and preliminary clinical study. *Aaps PharmSciTech*, 7 (3), 162-171.
86. PEPTIZYME SP in product sheet, Specialty Enzymes and Biochemicals Co.: USA.
87. Martindale: The Complete Drug Reference, S.C. Sweetman, Editor 2009, Pharmaceutical Press: USA.
88. Mohankumar, A., Raj, R.H.K. (2011) Production and Characterization of Serratiopeptidase Enzyme from *Serratia Marcescens*. *International Journal of Biology*, 3 (3), p39.
89. Longhi, C., Scoarughi, G.L., Poggiali, F., Cellini, A., Carpentieri, A., Seganti, L. ve diğerleri. (2008) Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. *Microbial pathogenesis*, 45 (1), 45-52.
90. Rawat, M., Saraf, S. (2009) Formulation optimization of double emulsification method for preparation of enzyme-loaded Eudragit S100 microspheres. *Journal of microencapsulation*, 26 (4), 306-314.
91. USP 36–NF 31 November 1, 2012 USA.
92. <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Vancomycin.svg&page=1>. Ağ

93. Hachicha, W., Kodjikian, L., Fessi, H. (2006) Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters. *International journal of pharmaceutics*, 324 (2), 176-184.
94. Voorn, G., Kuyvenhoven, J., Goessens, W., Schmal-Bauer, W., Broeders, P., Thompson, J. ve diğerleri. (1994) Role of tolerance in treatment and prophylaxis of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis with vancomycin, teicoplanin, and daptomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38 (3), 487-493.
95. Matzke, G., Zhanel, G., Guay, D. (1986) Clinical pharmacokinetics of vancomycin. *Clinical pharmacokinetics*, 11 (4), 257.
96. Ackerman, B., Taylor, E., Olsen, K., Abdel-Malak, W., Pappas, A. (1988) Vancomycin serum protein binding determination by ultrafiltration. *The Annals of Pharmacotherapy*, 22 (4), 300-303.
97. Bailey, E.M., Rybak, M., Kaatz, G. (1991) Comparative effect of protein binding on the killing activities of teicoplanin and vancomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35 (6), 1089-1092.
98. Golper, T.A., Noonan, H.M., Elzinga, L., Gilbert, D., Brummett, R., Anderson, J.L. ve diğerleri. (1988) Vancomycin pharmacokinetics, renal handling, and nonrenal clearances in normal human subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 43 (5), 565-570.
99. Rybak, M.J. (2006) The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. *Clinical infectious diseases*, 42 (Supplement 1), S35-S39.
100. Yap, I.K.S., Li, J.V., Saric, J., Martin, F.P., Davies, H., Wang, Y. ve diğerleri. (2008) Metabonomic and microbiological analysis of the dynamic effect of vancomycin-induced gut microbiota modification in the mouse. *Journal of proteome research*, 7 (9), 3718-3728.
101. Ghassempour, A., Darbandi, M.K., Asghari, F.S. (2001) Comparison of pyrolysis-mass spectrometry with high performance liquid chromatography for the analysis of vancomycin in serum. *Talanta*, 55 (3), 573-580.
102. Pfaller, M., Krogstad, D., Granich, G., Murray, P. (1984) Laboratory evaluation of five assay methods for vancomycin: bioassay, high-pressure liquid chromatography, fluorescence polarization immunoassay, radioimmunoassay, and fluorescence immunoassay. *Journal of clinical microbiology*, 20 (3), 311-316.
103. Farin, D., Piva, G.A., Gozlan, I., Kitzes-Cohen, R. (1998) A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 18 (3), 367-372.

104. Abu-Shandi, K.H. (2009) Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395 (2), 527-532.
105. Backes, D.W., Aboleneen, H.I., Simpson, J.A. (1998) Quantitation of vancomycin and its crystalline degradation product (CDP-1) in human serum by high performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 16 (8), 1281-1288.
106. Zhang, T., Watson, D., Azike, C., Tettey, J., Stearns, A., Binning, A. ve diğeri. (2007) Determination of vancomycin in serum by liquid chromatography–high resolution full scan mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 857 (2), 352-356.
107. Orsini, J., Ramberg, C., Benson, C., Dreyfuss, D., Vecchione, J., Kunz, C. (2008) Vancomycin kinetics in plasma and synovial fluid following intravenous administration in horses. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 15 (4), 351-363.
108. Ye, G., Cai, X., Wang, B., Zhou, Z., Yu, X., Wang, W. ve diğeri. (2008) Simultaneous determination of vancomycin and ceftazidime in cerebrospinal fluid in craniotomy patients by high-performance liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 48 (3), 860-865.
109. Shabir, G.A. (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987 (1), 57-66.
110. <http://tebeos.teb.org.tr/y/q0/> , Türk Eczacıları Birliği TEBEOS Eczane Otomasyon Programı, Ocak 2013.
111. Clinical and Laboratory Standards Institute., t.e., M07-A8., Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: approved standard, 2008), Clinical and Laboratory Standards Institute.
112. Jelvehgari, M., Barar, J., Valizadeh, H., HEYDARI, N. (2010) Preparation and evaluation of Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles-in-microparticles by W/O/W emulsion method. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*.
113. Roughley, P., Hoemann, C., DesRosiers, E., Mwale, F., Antoniou, J., Alini, M. (2006) The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation. *Biomaterials*, 27 (3), 388-396.
114. Gupta, H., Sharma, A., Shrivastava, B. (2009) Pluronic and Chitosan based In situ gel system for periodontal application. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3 (2), 94.

115. Lellouche, J., Friedman, A., Lellouche, J.P., Gedanken, A., Banin, E. (2012) Improved antibacterial and antibiofilm activity of magnesium fluoride nanoparticles obtained by water-based ultrasound chemistry. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8 (5), 702-711.
116. Jiang, P.J., Patel, S., Gbureck, U., Caley, R., Grover, L.M. (2009) Comparing the efficacy of three bioceramic matrices for the release of vancomycin hydrochloride. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 93 (1), 51-58.
117. Gracia, E., Lacleriga, A., Monzon, M., Leiva, J., Oteiza, C., Amorena, B. (1998) Application of a Rat Osteomyelitis Model to Compare *in Vivo* and *in Vitro* the Antibiotic Efficacy against Bacteria with High Capacity to Form Biofilms. *Journal of Surgical Research*, 79 (2), 146-153.
118. Efstathopoulos, N., Giamarellos-Bourboulis, E., Kanellakopoulou, K., Lazaretos, I., Giannoudis, P., Frangia, K. ve diğerleri. (2008) Treatment of experimental osteomyelitis by Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* with bone cement system releasing grepafloxacin. *Injury*, 39 (12), 1384-1390.
119. Yin, L.Y., Lazzarini, L., Li, F., Stevens, C.M., Calhoun, J.H. (2005) Comparative evaluation of tigecycline and vancomycin, with and without rifampicin, in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* experimental osteomyelitis in a rabbit model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55 (6), 995-1002.
120. Ye, F., Guo, H., Zhang, H., He, X. (2010) Polymeric micelle-templated synthesis of hydroxyapatite hollow nanoparticles for a drug delivery system. *Acta Biomaterialia*, 6 (6), 2212-2218.
121. Cevher, E., Orhan, Z., Mülazımoğlu, L., Şensoy, D., Alper, M., Yıldız, A. ve diğerleri. (2006) Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *International journal of pharmaceuticals*, 317 (2), 127-135.
122. Wan, Y., Zhang, D., Wang, Y., Qi, P., Wu, J., Hou, B. (2011) Vancomycin-functionalised Ag@ TiO₂ phototoxicity for bacteria. *Journal of hazardous materials*, 186 (1), 306-312.
123. Ashok R. Parmar, D.N.B., Dolita K. Shah and Kinjal V. Vekariya. (2012) Simultaneous estimation of Aceclofenac and Serratiopeptidase in Tablet Dosage Form by Absorbance Ratio Method using Visible Spectrophotometry. *Der Pharmacia Sinica*, 3 (3), 321-326.
124. Sandhya, K., Devi, S.G., Mathew, S. (2008) Quantitation of serrapeptase in formulations by UV method in the microplate format. *Current Drug Delivery*, 5 (4), 303-305.

125. Khan, S.A., Ahmad, M., Kousar, R., Murtaza, G. Nimesulide-Serratiopeptidase Sustained Release Microparticles–Combined Formulation and In Vitro Characterization.
126. Mao, S., Guo, C., Shi, Y., Li, L.C. (2012) Recent advances in polymeric microspheres for parenteral drug delivery-part 1. *Expert opinion on drug delivery* (0), 1-16.
127. Luciani, A., Coccoli, V., Orsi, S., Ambrosio, L., Netti, P.A. (2008) PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. *Biomaterials*, 29 (36), 4800-4807.
128. Ghaderi, R., Artursson, P., Carlfors, J. (1999) Preparation of biodegradable microparticles using solution-enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). *Pharmaceutical research*, 16 (5), 676-681.
129. Choi, S.W., Cheong, I.W., Kim, J.H., Xia, Y. (2009) Preparation of Uniform Microspheres Using a Simple Fluidic Device and Their Crystallization into Close-Packed Lattices. *Small*, 5 (4), 454-459.
130. Yang, Y.Y., Chung, T.S., Ping Ng, N. (2001) Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, 22 (3), 231-241.
131. Bordes, C., Fréville, V., Ruffin, E., Marote, P., Gauvrit, J., Briançon, S. ve diğerleri. (2010) Determination of poly (ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. *International journal of pharmaceutics*, 383 (1), 236-243.
132. Geraldes, A.N., Miyamoto, D.M., de Lira, R.A., Junior, J.A.O., Nascimento, N., Mariangela de Burgos, M. (October 24-28, 2011 2011). MICROSPHERES OF POLY (ϵ -CAPROLACTONE) LOADED HOLMIUM-165: MORPHOLOGY AND THERMAL DEGRADATION BEHAVIOR [Poster]. 2011 International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011. Belo Horizonte, MG, Brazil, .
133. Raval, J.P., Naik, D.R., Amin, K.A., Patel, P.S. Controlled-release and antibacterial studies of doxycycline-loaded poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of Saudi Chemical Society* (0).
134. Zhang, Y., Sun, L., Jiang, J., Zhang, X., Ding, W., Gan, Z. (2010) Biodegradation-induced surface change of polymer microspheres and its influence on cell growth. *Polymer Degradation and Stability*, 95 (8), 1356-1364.
135. Le Ray, A.M., Chiffolleau, S., Iooss, P., Grimandi, G., Gouyette, A., Daculsi, G. ve diğerleri. (2003) Vancomycin encapsulation in biodegradable poly (ϵ -caprolactone) microparticles for bone implantation. Influence of the

- formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility. *Biomaterials*, 24 (3), 443-449.
136. Freitas, S., Merkle, H.P., Gander, B. (2005) Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, 102 (2), 313-332.
 137. Sansdrap, P., Moes, A. (1993) Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *International journal of pharmaceuticals*, 98 (1), 157-164.
 138. Yang, Y.Y., Chung, T.S., Bai, X.L., Chan, W.K. (2000) Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science*, 55 (12), 2223-2236.
 139. Yang, Y.Y., Chia, H.H., Chung, T.S. (2000) Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 69 (1), 81.
 140. Jang, T.-S., Lee, E.-J., Kim, H.-E., Koh, Y.-H. (2012) Hollow porous poly(ϵ -caprolactone) microspheres by emulsion solvent extraction. *Materials Letters*, 72 (0), 157-159.
 141. Ramesh, D.V. (2009) Development of a Process for Microencapsulation of a Model Protein with Poly (ϵ -caprolactone) using a Modified W/O/O Technique. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 23 (1).
 142. Jeong, J.C., Lee, J., Cho, K. (2003) Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly (ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of controlled release*, 92 (3), 249-258.
 143. Abazinge, M., Jackson, T., Yang, Q., Owusu-Ababio, G. (2000) In vitro and in vivo characterization of biodegradable enoxacin microspheres. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*, 49 (2), 191-194.
 144. Kim, B., Hwang, S., Park, J., Park, H. (2005) Characteristics of felodipine-located poly (ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of microencapsulation*, 22 (2), 193-203.
 145. Persenaire, O., Alexandre, M., Degée, P., Dubois, P. (2001) Mechanisms and kinetics of thermal degradation of poly (ϵ -caprolactone). *Biomacromolecules*, 2 (1), 288-294.
 146. Atkins, T., Peacock, S., Yates, D. (1998) Incorporation and release of vancomycin from poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of microencapsulation*, 15 (1), 31-44.

147. Özalp, Y., Özdemir, N., Kocagöz, S., Hasirci, V. (2001) Controlled release of vancomycin from biodegradable microcapsules. *Journal of microencapsulation*, 18 (1), 89-110.
148. Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunou, N., Kawashima, Y. (1993) Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D, L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *Journal of controlled release*, 25 (1), 89-98.
149. Wang, J., Wang, B.M., Schwendeman, S.P. (2002) Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of controlled release*, 82 (2), 289-307.
150. Berkland, C., Kim, K., Pack, D.W. (2003) PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors. *Pharmaceutical research*, 20 (7), 1055-1062.
151. Berkland, C., Kipper, M.J., Narasimhan, B., Kim, K.K., Pack, D.W. (2004) Microsphere size, precipitation kinetics and drug distribution control drug release from biodegradable polyanhydride microspheres. *Journal of Controlled Release*, 94 (1), 129-141.
152. Alonso, M.J., Gupta, R.K., Min, C., Siber, G.R., Langer, R. (1994) Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine*, 12 (4), 299-306.
153. Bittner, B., Witt, C., Mäder, K., Kissel, T. (1999) Degradation and protein release properties of microspheres prepared from biodegradable poly (lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: influence of buffer media on polymer erosion and bovine serum albumin release. *Journal of controlled release*, 60 (2), 297-309.
154. Mehta, R.C., Thanoo, B., Deluca, P.P. (1996) Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly (d,l-lactide-co-glycolide). *Journal of controlled release*, 41 (3), 249-257.
155. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, A., Haas, N., Raschke, M. (2001) Biodegradable poly (D, L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *Journal of biomedical materials research*, 58 (4), 449-455.
156. Monzon, M., García-Álvarez, F., Lacleriga, A., Gracia, E., Leiva, J., Oteiza, C. ve diğerleri. (2006) A simple infection model using pre-colonized implants to reproduce rat chronic *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and study antibiotic treatment. *Journal of Orthopaedic Research*, 19 (5), 820-826.
157. Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C.R. (2006) The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*, 27 (11), 2331-2339.

158. Volland, C., Wolff, M., Kissel, T. (1994) The influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of controlled release*, 31 (3), 293-305.
159. Herrero-Vanrell, R., Ramirez, L. (2000) Biodegradable PLGA microspheres loaded with ganciclovir for intraocular administration. Encapsulation technique, in vitro release profiles, and sterilization process. *Pharmaceutical research*, 17 (10), 1323-1328.
160. Carrascosa, C., Espejo, L., Torrado, S., Torrado, J. (2003) Effect of γ -Sterilization Process on PLGA Microspheres Loaded with Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I). *Journal of biomaterials applications*, 18 (2), 95-108.
161. Çalış, S., Bozdağ, S., Kaş, H.S., Tunçay, M., Hıncal, A.A. (2002) Influence of irradiation sterilization on poly (lactide-co-glycolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs. *Il Farmaco*, 57 (1), 55-62.
162. de Tayrac, R., Chentouf, S., Garreau, H., Braud, C., Guiraud, I., Boudeville, P. ve diğerleri. (2008) In vitro degradation and in vivo biocompatibility of poly (lactic acid) mesh for soft tissue reinforcement in vaginal surgery. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 85 (2), 529-536.
163. Herrero-Vanrell, R., Refojo, M.F. (2001) Biodegradable microspheres for vitreoretinal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 52 (1), 5-16.
164. Shameem, M., Lee, H., Burton, K., Thanoo, B., Deluca, P.P. (1999) Effect of γ -Irradiation on Peptide-Containing Hydrophilic Poly (D, L-lactide-co-glycolide) Microspheres. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 53 (6), 309-313.
165. Yang, Y., Gao, Y., Mei, X. (2011) Effects of gamma-irradiation on PLGA microspheres loaded with thienorphine. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66 (9), 694-697.
166. Fernandez-Carballido, A., Herrero-Vanrell, R., Molina-Martinez, I., Pastoriza, P. (2004) Sterilized ibuprofen-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres for intra-articular administration: effect of γ -irradiation and storage. *Journal of microencapsulation*, 21 (6), 653-665.
167. Spenlehauer, G., Vert, M., Benoit, J.P., Chabot, F., Veillard, M. (1988) Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: Morphology and release characteristics. *Journal of controlled release*, 7 (3), 217-229.
168. Bartolotta, A., D'Oca, M., Campisi, M., De Caro, V., Giandalia, G., Giannola, L. ve diğerleri. (2005) Effects of gamma-irradiation on trehalose-hydroxyethylcellulose microspheres loaded with vancomycin. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 59 (1), 139-146.

169. Desai, S.D., Blanchard, J. (1998) In vitro evaluation of pluronic F127-based controlled-release ocular delivery systems for pilocarpine. *Journal of pharmaceutical sciences*, 87 (2), 226-230.
170. Jain, S.P., Shah, S.P., Rajadhyaksha, N.S., Singh PS, P.P., Amin, P.D. (2008) In situ ophthalmic gel of ciprofloxacin hydrochloride for once a day sustained delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 34 (4), 445-452.
171. Jarry, C., Chaput, C., Chenite, A., Renaud, M.A., Buschmann, M., Leroux, J.C. (2001) Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. *Journal of biomedical materials research*, 58 (1), 127-135.
172. Jarry, C., Leroux, J.C., Haeck, J., Chaput, C. (2002) Irradiating or Autoclaving Chitosan/Polyol Solutions: Effect on Thermogelling Chitosan-. BETA.-glycerophosphate Systems. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 50 (10), 1335-1340.
173. Hong, Y., Song, H., Gong, Y., Mao, Z., Gao, C., Shen, J. (2007) Covalently crosslinked chitosan hydrogel: Properties of *in vitro* degradation and chondrocyte encapsulation. *Acta biomaterialia*, 3 (1), 23-31.
174. Ruel-Gariépy, E., Leroux, J.C. (2004) In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58 (2), 409-426.
175. Lenaerts, V., Triqueneaux, C., Quartern, M., Rieg-Falson, F., Couvreur, P. (1987) Temperature-dependent rheological behavior of Pluronic F-127 aqueous solutions. *International journal of pharmaceutics*, 39 (1), 121-127.
176. Yılmaz, R. (2007). Viskoz malzemelerin akışı ve modellenmesi Yıldız Teknik Üniversitesi İstanbul.
177. Priyanka, M., Meenakshi, B. Study of Secnidazole-Serratiopeptidase Alginate/HPMC Gels For Periodontal Delivery.
178. Muhl, E., Gatermann, S., Iven, H., Dendorfer, A., Bruch, H.P. (1996) Local application of vancomycin for prophylaxis of graft infection: release of vancomycin from antibiotic-bonded Dacron grafts, toxicity in endothelial cell culture, and efficacy against graft infection in an animal model. *Annals of vascular surgery*, 10 (3), 244-253.
179. Joosten, U., Joist, A., Gosheger, G., Liljenqvist, U., Brandt, B., von Eiff, C. (2005) Effectiveness of hydroxyapatite-vancomycin bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis. *Biomaterials*, 26 (25), 5251.
180. Tang, L.H., Zhao, C.H., Xiong, Y., Pan, C.J., Wang, A.M. (2009) Preparation, release profiles, and antibacterial properties of vancomycin-loaded poly (D, L-lactic) titanium alloy plates. *Orthopedics*, 32 (5), 324.

181. Veyries, M.L., Faurisson, F., Joly-Guillou, M.L.,Rouveix, B. (2000) Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (4), 1093-1096.
182. Singh, D., Dixit, V., Saraf, S.,Saraf, S. (2009) Formulation Optimization of Serratiopeptidase-loaded PLGA Microspheres Using Selected Variables. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 63 (2), 103-112.
183. Herigstad, B., Hamilton, M.,Heersink, J. (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44 (2), 121-129.
184. Anderl, J.N., Franklin, M.J.,Stewart, P.S. (2000) Role of antibiotic penetration limitation in Klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (7), 1818-1824.
185. Thaller, M., Selan, L., Fiorani, P., Passariello, C., Rizzo, L.,Speziale, F. (1997) A comparative in vitro evaluation of different therapeutic protocols for vascular graft infections. *European journal of vascular and endovascular surgery: the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, 14, 35.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Elif SARIGÖL

E-mail: esarigol@hacettepe.edu.tr - sarigol.elif@gmail.com

Doğum Tarihi ve Yeri: 21 Ocak 1986, Ankara

Uyruğu: T.C.

Yabancı Diller:

Almanca (İyi derecede), İngilizce (Yüksek derece)

Eğitim:

İlk Öğretim: Tevfik İleri İlköğretim Okulu (1992-1997)

Ortaöğretim-Lise: Ankara Anadolu Lisesi – Almanca (1997-2004)

Lisans: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2005-2010)

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı (2010-)

Profesyonel İş ve Staj Deneyimleri:

Staj: DROGSAN AR-GE Departmanı Stajı (2009 Temmuz – 1 ay)

İş: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı - Araştırma Görevlisi (2011-)

Alınan Derece ve Ödüller:

2006 İstanbul Eczacılık Kongresi Eczacılık Fakülteleri öğrencileri arası şiir yarışması, 3.lük ödülü

Kurduğu Topluluklar:

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Resim Topluluğu (ANEREST) (2006 -2010)

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)

Hacettepe Eczacılık Teknolojisi Derneği (HETEK)

Katıldığı Bilimsel Toplantılar:

10. Türkiye Eczacılık Kongresi, 2010, Ankara

15th International Pharmaceutical Technology Symposium, 2010, Antalya

International Symposium on Drug Research and Development “From Chemistry to Medicine” DRD 2011, Antalya

18th International Symposium on Microencapsulation, 2011, Antalya

16th International Pharmaceutical Technology Symposium, 2012, Antalya

Projeler:

Medikal Cihaz Uygulamalarına Bağlı Olarak Gelişen Biyofilm Bazlı Osteomyelit Tedavisi İçin Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyonu Ve İn Vitro/İN Vivo Değerlendirilmesi, TÜBİTAK Projesi, SBAG – 111S275, Kasım 2011-Kasım 2012

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler:

E. Sarıgöl, S. Bozdağ-Pehlivan, S. Çalış, “Vancomycin Hcl Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Microspheres: Preparation And In Vitro Characterization”, 16th International Pharmaceutical Technology Symposium, 2012, Antalya

EKLER

EK 1: H.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

EK 2: Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
 Telefon: 0 312 305 1090-1092 • Faks: 0 312 310 0580
 www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_etik.pdf

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 46

31 Mayıs 2011

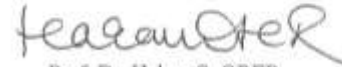
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 24.05.2011 (SALİ)
 TOPLANTI SAYISI : 2011/3
 DOSYA KAYIT NUMARASI : 2011/32
 KARAR NUMARASI : 2011/32-7
 ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof. Dr. Bülent Atilla
 HAYVAN DENEYLERİNDEN : Yrd. Doç. Dr. Ömür Çağlar
 SORUMLU ARAŞTIRMACI :
 YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Prof. Dr. Sema Çalış, Yrd. Doç. Dr. Sibel Pehlivan,
 Dr. Ecz. Yasemin Çırpanlı
 ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : 40 adet Yeni Zelanda tipi Albino Tavşan
 ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ : 24 ay

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Bülent Atilla'nın yürütücüsü olduğu 2010/45 dosya numaralı ve "Medikal Cihaz Uygulamalarına Bağlı Olarak Gelişen Biyofilm Bazlı Osteomyelli Tedavisi İçin Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyonu ve In Vitro / In Vivo Değerlendirilmesi" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Kurul üyesi Prof. Dr. S. Çalış çıkar çalışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür



Prof. Dr. Hakan S. ORER
 Etik Kurul Başkanı

VANCOMYCIN HCL LOADED POLY(ϵ -CAPROLACTONE) MICROSPHERES: PREPARATION AND IN VITRO CHARACTERIZATION

E. Sarıgöl, S. Bozdağ-Pehlivan, S. Çalış

Hacettepe University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Technology, 06100 Ankara, Turkey

INTRODUCTION

Osteomyelitis is typically characterized by an acute or chronic inflammatory response often leading to bone loss and the spread of infection to surrounding tissues (1). Systemic administration of broad-spectrum antibiotics is insufficient to diminish the rate of chronic infection, and sustained high local concentrations of antibacterial compounds for 4 or 6 weeks are necessary for the prevention and treatment of this disease. Biodegradable microparticles offer an attractive alternative as drug delivery systems for long-term administration of drug because they provide local and sustained drug release with minimal side-effects (2). Vancomycin is a broad-spectrum glycopeptide antibiotic which is active against Gram-positive organisms. It is used particularly in the treatment and prophylaxis of staphylococcal infections including those due to MRSA and one of the drugs of choice against pathogens for osteomyelitis (3). In this study, Vancomycin HCl (VH) loaded Poly(ϵ -Caprolactone) (PCL) (Mw: 14,000, Mn: 60,000, Mr: 70,000-90,000) microspheres were prepared and in vitro characterization study (particle size, yield, drug loading, drug release) were carried out.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Mw: 14,000, Mn: 60,000, Mr: 70,000-90,000) and Poly(Vinyl Alcohol) Mw 30,000-70,000 was purchased from Sigma-Aldrich. Vancomycin HCl (VH) was a gift from Sandoz Pharm. Co. (Turkey). All the other chemicals used were analytical grade.

Methods

Preparation of VH loaded PCL Microspheres

Microspheres containing VH were prepared by water-in-oil-in-water (w/o/w) technique (4). For this purpose, polymer and drug in aqueous PVA solution (0.05 % or 0.1 %) was emulsified by vortex and injected into aqueous PVA solution (0.1%) and stirred continuously (3000 rpm) at room temperature for 1 h. Then, this dispersion transferred into PVA solution (0.5 %) and stirred continuously (800 rpm) at room temperature for 1 h until the evaporation of dichloromethane was completed. Finally, the resulting microspheres were collected by filtration, washed with water and lyophilized.

Particle Size Analysis

Mean particle size (diameter, $\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$) of the microspheres were determined by Malvern Mastersizer (Malvern Instruments, Malvern, UK) in triplicate.

Yield

The production yield of the microspheres was determined by calculating accurately the initial weight of the raw materials and the last weight of the polymeric particles obtained.

Drug Encapsulation Efficiency

Drug loading value of the microspheres was determined according to the following procedure: VH loaded microspheres (50 mg) was suspended in distilled water using vortex and centrifuged. The supernatant was filtered and analyzed by HPLC. The residual microspheres was dissolved in dichloromethane, and then drug extracted to distilled water. The samples were filtered and analyzed by HPLC. The loading efficiency (%) was calculated according to the following equation: Loading efficiency (%) = (actual drug content in microparticles/theoretical drug content) \times 100

HPLC Analysis

The analysis of VH was performed using HP Agilent 1200, USA. It was equipped with a C18 column (10 μm 125A, 3.9 \times 300 mm, μ konopak, Waters, UK). The HPLC conditions used were similar to those reported by US Pharmacopoeia 30-NF25 (5). Validation of the method used was realized by determination of linearity, accuracy, precision, sensitivity and specificity ($r^2=0.9999$).

In Vitro Drug Release from Microspheres

In vitro release of VH from microsphere formulations was determined in 2 mL of isotonic PBS (pH 7.4) providing sink conditions in a thermostated shaker bath system (Memmert, Schwabach, Germany) at 37°C with the dialysis technique (Spectra/Por Cellulose Ester Membrane MWCO-300,000 Da, Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA). At predetermined time intervals, whole sample was withdrawn from the system and replaced with equal volume of fresh release medium maintained at the same temperature. The released amount of drug was analysed by HPLC.

RESULTS AND DISCUSSION

Particle size and the encapsulation efficiency of VH loaded microspheres are presented in Table 1. As presented in Table 1, the particle size of the formulations were between 58-134 μm with uniform distribution. Also, the results indicated that the molecular weight of the PCL had an effect on the particle sizes of the microspheres. The increasing in Mw of the polymer caused an increase of the particle size. Similarly, the higher drug loading values were obtained with the higher Mw polymer (Table 1).

Table 1: Particle Size and Encapsulation Efficiency of VH loaded PCL Microspheres

Formulation Code	PCL Mw/ Inter phase PVA	Polymer/ VH (w/w) (mg)	Particle Size (μm) \pm SD	Yield %	Encapsulation Efficiency (%)
A1	14000/0,05%	600/50	58,05 \pm 1,89	73,11	4,77
A2	14000/0,1%	600/50	58,08 \pm 1,33	74,32	4,38
B1	60000/0,05%	600/50	71,84 \pm 5,62	56,62	46,75
B2	60000/0,1%	600/50	76,36 \pm 1,93	65,83	47,23
C1	80000/0,05%	600/50	134,12 \pm 1,98	47,51	54,85
C2	80000/0,1%	600/50	120,15 \pm 1,43	49,6	58,58

In vitro release profile of VH from the microspheres is presented in Figure 1.

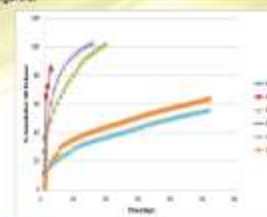


Figure 1: In vitro release profile of VH from PCL microspheres

As presented in Figure 1, VH release from low Mw PCL microspheres was faster: 100, 100, 83, 95, 29 and 36 % of VH released in 10 days for formulation A1, A2, B1, B2, C1 and C2 respectively.

CONCLUSIONS

In vitro results indicated that PCL microspheres containing VH can be proposed as a promising long-term delivery system for the treatment of osteomyelitis.

REFERENCES

- (1) A. Diona, M. Langrana, G. Halb, M. Fflaggi, Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment, *BIONATERIALS*, Volume 26, Issue 35, December 2005, Pages 7216-7285
- (2) Maria Rosa Vitoria, Begonia Elorab, Susana Torreda, Maria de Los Angeles Elorab, Gloria Frutos, Improvement of gentamicin poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for treatment of osteomyelitis induced by orthopedic procedures, *Biomaterials* Volume 28, Issue 5, February 2007, Pages 877-885
- (3) Erdal Cevhena, Zifer Orhanb, Lutfiye Milazimođub, Demet Şensoya, Murat Alperd, Ayca Yıldıza, Yıldı Özsoya, Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 317, Issue 2, 24 July 2006, Pages 127-135
- (4) M.-A. Benoit, B. Baras, J. Gillard, Preparation and characterization of protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 184 (1999) 73-84

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to acknowledge 1115275 TÜBİTAK project for financial support.