

278938

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
AĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STREPTOMİSİN SÜLFAT MİKROKÜRELERİNİN HAZIRLANMASI,  
İN VİTRO SALIVERİLMESİ  
ve  
İN VİVO DAĞILIMI ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI**

**BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

**Ecz. Hasan GÜRKAN**

**ANKARA 1985**

T.C.

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STREPTOMİSİN SÜLFAT MIKROKÜRELERİNİN HAZIRLANMASI,  
İN VİTRO SALIVERİLMESİ

ve

İN VİVO DAĞILIMI ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Ecz.Hasan GÜRKAN

Rehber Öğretim Üyesi: Doç.Dr.H.Süheyla Kaş

ANKARA 1985

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
I. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
I. GENEL BİLGİLER.....	3
I.1. MİKROKÜRELER.....	3
I.1.1. Tanımı.....	3
I.1.2. Özellikleri.....	4
I.1.3. Hazırlama Yöntemleri.....	5
I.1.3.1. Emülsiyon Polimerizasyonu Yöntemi.....	6
I.1.3.2. Organik Çözücüden Faz Ayrılması Yöntemi .....	9
I.1.4. Matriks Maddeleri.....	9
I.1.5. Radyoaktif Olarak İşaretlenmesi.....	11
I.1.6. Hedeflendirilmesi.....	16
I.1.6.1. Pasif Hedeflendirme.....	18
I.1.6.2. Aktif Hedeflendirme.....	20
I.1.7. Etken Maddenin Salıverilmesi.....	28
I.1.7.1. Salıverilmeyi İncelemekte Kullanılan İn Vitro Yöntemler.....	28
I.1.7.2. Salıverilme Kinetiği.....	28
I.1.7.3. Salıverilmeyi Etkileyen Faktörler.....	32
I.1.8. Toksisite Çalışmaları.....	36
I.1.9. Uygulama Alanları.....	37
I.2. STREPTOMİSİN SÜLFAT.....	38
I.2.1. Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri.....	38
I.2.2. Miktar Tayini Yöntemleri.....	39
I.2.3. Stabilite Çalışmaları.....	40
I.2.4. Farmakolojik Özellikleri.....	42

II. DENEYSEL.....	44
II.1. Araç ve Gereçler.....	44
II.1.1. Kullanılan Maddeler.....	44
II.1.2. Kullanılan Aletler.....	44
II.2. YÖNTEMLER ve DENEYLER.....	45
II.2.1. Kimyasal ve Fizikokimyasal İncelemeler.....	46
II.2.1.1. Streptomisin Sülfat'ın Standardizasyonu.....	46
II.2.1.1.1. U.V. Spektrumu.....	46
II.2.1.1.2. I.R. Spektrumu.....	46
II.2.1.1.3. Erime Noktası Tayini.....	46
II.2.1.1.4. Partikül Büyüklüğünün Saptanması.....	46
II.2.1.1.5. Aktivite Tayini.....	46
II.2.1.1.6. Streptomisin Sülfat'ın İnce Tabaka Kroma- tografisi ile Tanınması.....	47
II.2.1.2. Streptomisin Sülfat'ın Stabilitesi.....	47
II.2.1.2.1. Parçalanma Ürünlerinin Kağıt Kromatografisi ile Ayrılması.....	47
II.2.1.2.2. İn Vitro Salıverilmesi Sırasında Stabilite- sinin İncelenmesi.....	48
II.2.1.2. Streptomisin Sülfat'ın Miktar Tayini.....	48
II.2.1.3.1. Standart Eğri.....	50
II.2.1.4. Matriks Maddelerinin Standardizasyonu.....	50
II.2.1.4.1. Jelatinin İzoelektrik Noktasının Tayini....	51
II.2.1.4.2. Albuminin İzoelektrik Noktasının Tayini....	51
II.2.1.5. Kullanılan Bitkisel Yağların Standardizasyonu	52

II.2.1.5.1. Pamuk ve Mısır Yağının Viskozite Tayini.	52
II.2.2. Mikrokürelerin Hazırlanması ve Özelliklerinin Tayini.....	52
II.2.2.1. Mikrokürelerin Hazırlanması.....	52
II.2.2.1.1. Albumin Mikrokürelerinin Hazırlanması...	53
II.2.2.1.2. Jelatin Mikrokürelerinin Hazırlanması...	55
II.2.2.2. Mikrokürelerin Özelliklerinin Tayini.....	56
II.2.2.2.1. Şekil ve Büyüklükleri.....	56
II.2.2.2.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımları.....	56
II.2.2.2.3. Mikrokürelerdeki Streptomisin Sülfat Miktarı ve Mikroküre Hazırlama Verimi.....	56
II.2.3. Streptomisin Sülfat'ın Mikrokürelerden İn Vitro Salıverilmesinin İncelenmesi.....	57
II.2.3.1. Salıverilme Ortamı.....	57
II.2.3.2. Salıverilme Hücresi.....	58
II.2.3.3. Deneyin Yapılışı.....	58
II.2.3.4. Verilerin Gösterilişi.....	60
II.2.4. Mikrokürelerin Organizmadaki Dağılımlarının İn Vivo İncelenmesi.....	60
II.2.4.1. Deneyde kullanılan Serbest Streptomisin Sülfat'ın ve Mikrokürelerin İşaretlenmesi.	60
II.2.4.1.1. Serbest Streptomisin Sülfatın <sup>99m</sup> Tc ile İşaretlenmesi.....	60
II.2.4.1.2. Albumin Mikrokürelerin <sup>99m</sup> Tc ile İşaretlenmesi.....	61
II.2.4.1.3. Jelatin Mikrokürelerinin <sup>99m</sup> Tc ile İşaretlenmesi.....	61

II.2.4.1.4. İşaretleme Kalite Kontrolü.....	62
II.2.4.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımları.....	62
II.2.4.3. Deneyde Kullanılan Hayvanlar.....	62
II.2.4.4. Deneyin Yapılışı.....	63
II.2.4.5. Verilerin Gösterilişi.....	65
III. BULGULAR.....	66
III.1. Kimyasal ve Fizikokimyasal İncelemelere Ait Bulgular.....	66
III.1.1. Streptomisin Sülfat'ın Standardizasyonu.....	66
III.1.1.1. U.V. Spektrumu.....	66
III.1.1.2. I.R. Spektrumu.....	66
III.1.1.3. Erime Noktası Tayini.....	66
III.1.1.4. Partikül Büyüklüğü Dağılımı.....	69
III.1.1.5. Aktivite Tayini.....	69
III.1.1.6. İnce Tabaka Kromatografisi ile Tanınması.....	71
III.1.2. Streptomisin Sülfat'ın Stabilite Deneylerinin Bulguları.....	71
III.1.2.1. Parçalanma Ürünlerinin Kağıt Kromatografisi ile Ayrılması.....	71
III.1.2.2. Streptomisin Sülfat'ın Mikrokürelerden İn Vitro Salıverilmesi Sırasında Stabilite- sinin İncelenmesi.....	72
III.1.3. Streptomisin Sülfat'ın Miktar Tayini.....	73
III.1.3.1. Standart Eğri.....	76
III.1.4. Matriks Maddelerinin Standardizasyonu.....	76

III.1.4.1. Jelatinin izoelektrik Noktası.....	76
III.1.4.2. Albuminin izoelektrik Noktası.....	83
III.1.5. Kullanılan Bitkisel Yağların Standardizasyonu..	83
III.1.5.1. Pamuk ve Mısır Yağının Viskoziteleri.....	83
III.2. Hazırlanan Mikrokürelere Ait Bulgular.....	84
III.2.1. Mikrokürelere Ait Özellikleri.....	84
III.2.1.1. Şekil ve Büyüklükleri.....	84
III.2.1.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımları.....	84
III.2.1.3. Mikrokürelere Ait Streptomisin Sülfat Miktarı ve Mikroküre Hazırlama Verimi.....	86
III.3. Streptomisin Sülfat'ın Mikrokürelere Ait Salıverilmesine İlişkin Bulgular.....	89
III.3.1. Verilerin Gösterilişi.....	89
III.3.2. Deneylemlerin Tekrarlanabilirliği.....	91
III.4. Mikrokürelere Ait Organizmadaki Dağılımları.....	91
III.4.1. <sup>99m</sup> Tc ile İşaretlemenin Kalite Kontrolü.....	91
III.4.2. Kullanılan Mikrokürelere Ait Büyüklük Dağılımları.	92
III.4.3. i.v. Olarak Verilen <sup>99m</sup> Tc ile İşaretli Serbest Streptomisin Sülfat'ın ve Mikrokürelere Ait Orga- nizmadaki Dağılımlarının İncelemesine Ait Bulgular.....	96
III.4.3.1. Serbest Streptomisin Sülfat'ın İnceleme Dağılım Verilerinin Gösterilişi.....	96
III.4.3.2. Albumin Mikrokürelere Ait İnceleme Verilerinin Gösterilişi.....	96
III.4.3.3. Jelatin Mikrokürelere Ait İnceleme Verilerinin Gösterilişi.....	96

IV. TARTIŞMA.....	105
IV.1. Streptomisin Sülfat'ın Stabilitesi.....	105
IV.2. Streptomisin Sülfat'ın Miktar Tayini.....	106
IV.3. Mikrokürelerin Hazırlanması ve Özellikleri.....	107
IV.4. Streptomisin Sülfat'ın Mikrokürelerden In Vitro Salıverilmesi.....	110
IV.5. Mikrokürelerin Organizmadaki Dağılımlarının In Vivo İncelenmesi.....	113
ÖZET.....	117
SUMMARY.....	119



## GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda kemoterapötik etken maddelerin sistemik dağılımlarını değiştirerek vücudun belirli organ veya bölgelerine hedeflendirilmelerini sağlamak amacıyla farklı yapıda taşıyıcı sistemleri tasarlanmıştır. Günümüzde büyük bir ilgi gören bu sistemler; lipozomlar<sup>1,2</sup>, eritrositler<sup>3,4</sup>, mikroküre/yağ emülsiyonları<sup>5,6</sup>, geçirgen polimerik mikrokapsüller<sup>7</sup>, nanopartiküller<sup>8,9</sup> ve mikrokürelerden<sup>10,11</sup> oluşmaktadır.

Bu araştırmada mikroküreleri hazırlanmak üzere etken madde olarak seçilen streptomisin sülfat, yaklaşık 40 yıldan beri tüberkülostatik bir ilaç olarak kullanılmaktadır<sup>12</sup>. Barsak kanalından hiç absorplanmadığından tedavide oral yolla kullanımı yoktur<sup>13</sup>.

Sistemik tedavi amacıyla i.m. yolla verilmekte fakat enfeksiyon yerinde ağrı ve irritasyon oluşabilmektedir<sup>14</sup>. Özellikle sekizinci sinir üzerinde etkin olan bazı sistemik yan etkilere de sahiptir. Yüksek dozlarda verildiğinde bu etkiler şiddetlenmektedir<sup>15</sup>.

Bu araştırmanın amacı, streptomisin sülfat mikroküreleri hazırlamak, in vitro salıverilmeyi incelemek ve i.v. verildiğinde doğrudan doğruya akciğerlerde toplanmasını sağlayarak daha düşük dozda etken madde ile hem toksisiteyi

düşürmek, hem de yüksek etki elde etmek ve böylece bu preparat şekli ile, ülkemizde büyük bir önemi olan, tüberküloz hastalığının tedavisine daha akılcı bir yaklaşım getirmektedir.

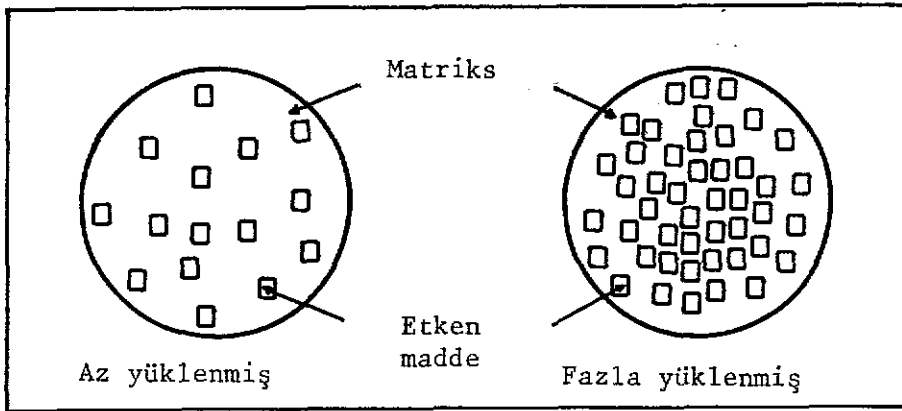
## I. GENEL BİLGİLER

### I.1. MİKROKÜRELER

#### I.1.1. Tanımı

İlaç etkisinin optimizasyonu için iki yaklaşım sözkonusudur; bunlardan birincisi ve en çok bilineni, özel reseptör için hem etkin hem de seçici olan yeni moleküllerin tasarımıdır. Bu yolla terapötik açıdan yararlı bir hedef-ilaç ilişkisinin sağlanması düşünülen çok daha güçtür ve istenmeyen yan etkiler her zaman görülebilir. Daha basit olan ikinci yaklaşım ise etken maddeleri vücudun istenen bölgelerine hedeflendirerek orada salıverilmelerini sağlayan taşıyıcı sistemlerin kullanılmasıdır<sup>16</sup>. İşte bu ikinci yaklaşımdan hareketle hazırlanan taşıyıcı sistemlerden birisi olan mikroküreler, önceleri değişik amaçlarla kullanılmıştır. Özellikle intravenöz (i.v.) veya intraarteriyel (i.a.) yolla verilen radyoaktif maddeyle işaretlenmiş mikroküreler, dolaşım sisteminin ve retiküloendotelial sistemin (RES) fonksiyonel olarak incelenmesi, çeşitli organların teşhis amacıyla taraması ve hücre separasyonu amacıyla kullanılmıştır<sup>17,18,19,20,21,22</sup>. Farmasötik amaçlı mikroküreler ise lineer makromoleküllü taşıyıcılara bir alternatif olarak farklı yapıdaki matriks maddelerinin kullanılmasıyla geliştirilen üç boyutlu taşıyıcı sistemlerdir<sup>16,23,24,25</sup>. Çapları 0,02-300 µm arasında değişen<sup>26</sup> ve tekdüze etken madde içeren bu taşıyıcılar Şekil 1'de görüldüğü gibi yekpare (monolitik) bir yapıya sahiptirler<sup>27,28</sup>.

Bu sistemler, vücudun doğal dağılım modelinden yararlanılarak (pasif olarak) hedeflendirilebilecekleri gibi<sup>29,30,31</sup>, bazı özel yöntemlerle de organizmada istenen dokuya yönlendirilebilirler<sup>32,33,34</sup>.



Şekil 1: Mikrokürelerin Yapısı<sup>27</sup>

### I.1.2. Özellikleri

Mikrokürelerin de dahil olduğu hedeflendirilebilen ideal bir ilaç dağıtım sisteminde bulunması gerekli özellikler şu şekilde sıralanmıştır<sup>3,34</sup>:

1. Sadece istenen hedef dokuya veya organa özgü bir ilaç dağıtımına olanak sağlamalı
2. Kapilerler içinden geçmeye uygun büyüklük ve şekle sahip olmalı
3. Hedef bölgeye ulaşmadan önce önemli bir ilaç sızıntısına yol açmamalı ve hedef bölgede uzun süre ilaç aktivitesini korumalı
4. İlacın doku parankimasına girmesine yardımcı olmalı

5. İlacı kontrol edilebilen bir hızla salıvermeli
6. Biyolojik sistemle geçimli ve toksik etkileri minimum olmalı
7. Hedef bölgeye ulaşabilmesi için biyolojik yarılanma ömrü yeterli olmalı
8. Farklı özelliklere sahip ve geniş bir ilaç çeşidini taşıyabilmeli
9. Enkapsülasyon ve bağlanma sırasında ilaçların özelliklerini ve aktivitelerini değiştirmemeli
10. İlacın klinik olarak uygun miktarlarda dağıtımına izin vermek için yeterli bir ilaç taşıyabilme kapasitesine sahip olmalı
11. İlacın plazma enzimleri tarafından inaktive edilmesini önleyebilmeli
12. Biyolojik yıkımlanma ile vücuttan uzaklaştırılabilmesi
13. Kolay hazırlanabilmeli
14. Saklanması sırasında etken madde ve taşıyıcı açısından dayanıklı, yani uzun bir raf ömrüne sahip olmalıdır.

Yukarıda sıralanan özellikler, ideal bir ilaç taşıyıcı sistemi için sözkonusudur. Hazırlanan bir taşıyıcı bu özelliklerin hepsine birden sahip olmayabilir.

### I.1.3. Hazırlama Yöntemleri

Mikroküreler, emülsiyon polimerizasyonu<sup>17,23,24,30,35</sup> veya organik çözücüden faz ayrılması yöntemi ile hazırlan-

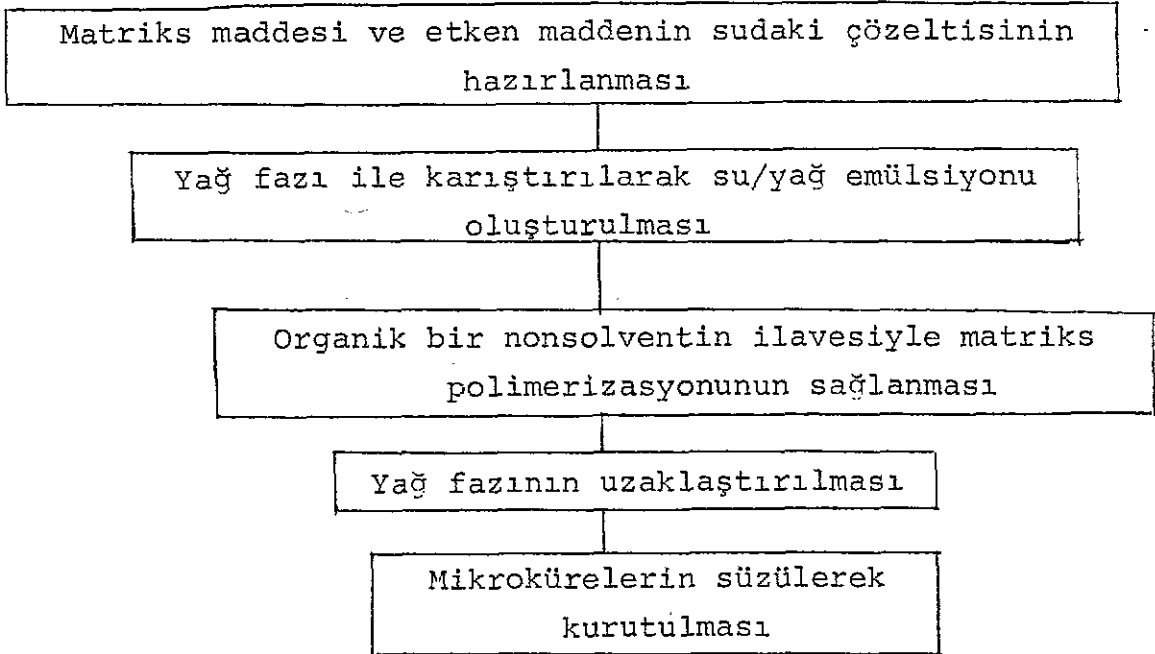
maktadır<sup>36,37</sup>.

### I.1.3.1. Emülsiyon Polimerizasyonu Yöntemi

Yöntemin esası, su/yağ emülsiyonundan hareketle mat-riksi polimerize etmeye dayanmaktadır<sup>17,23,35</sup>.

Bu yöntemle mikroküre hazırlama işlemi Tablo 1'de gösterilmiştir.

TABLO 1: Emülsiyon Polimerizasyonu Yöntemi ile Mikroküre Hazırlama İşlemi



Bu yöntemde su/yağ emülsiyonu oluşturmak amacıyla yağ fazı olarak pamuk yağı, zeytin yağı, mısır yağı ve ayçi-çeği yağı gibi bitkisel yağlar kullanıldığı gibi<sup>17, 23,28,30,38</sup>. Kloroform, isooktan ve toluen gibi organik çözücüler de kullanılmıştır<sup>39,40,41,42,43,44,45,46,47</sup>.

Eğer mikrokürelere magnetik olarak hedeflendirilebilir özellik kazandırılmak isteniyorsa matriks çözeltisine magnetit ( $Fe_2O_3$ ) ilave edilerek aynı şekilde hazırlanmalıdır<sup>23,47,48</sup>.

Bu yöntemle hazırlama işlemi sırasında mikrokürelerin sertleştirilmesi (stabilizasyon) gerekmektedir. Bu amaçla iki yol izlenmektedir.

a) Yüksek ısı ile Stabilizasyon

Eğer yüksek ısı ile denatüre olabilen bir matriks maddesi kullanılmış ise mikroküre hazırlama işlemi yüksek ısıda yürütülerek mikrokürelerin stabilizasyonu sağlanır<sup>17,19,23,24,25,42,49,50,51,52,53,54,55,56</sup>.

b) Karbonil Bileşikleri ile Stabilizasyon

Eğer matriks maddesinin veya etken maddenin kimyasal yapısı yüksek ısı uygulanmasına elverişli değil ise, hazırlama işlemi oda sıcaklığında yürütülerek matriks polimerize edilir<sup>26</sup>. Bu şekilde hazırlanan mikroküreler, matriks yüzeyinde çapraz bağ oluşturma özelliğine sahip karbonil bileşikleri ile muamele edilerek stabilize edilirler<sup>23,30,57</sup>. Yapılan değişik çalışmalarda çapraz bağ yapıcı olarak kullanılan maddeler, formaldehid, 2,3-butandion ve glutaraldehyd<sup>23,30</sup> 40.

Widder ve ark<sup>23,25,58</sup>, emülsiyon polimerizasyonu yöntemi uygulayarak hazırladıkları albumin mikrokürelerini hem yüksek ısı ile hem de karbonil bileşikleri ile stabilize etmişlerdir.

Hashida ve ark.<sup>1</sup> ve Yoshioka ve ark.<sup>30</sup> mitomisin C taşıyan jelatin mikroküreleri hazırlamak için emülsiyon polimerizasyon yöntemini kullanmışlar ve formaldehid ile çapraz bağ oluşturarak mikroküreleri sertleştirmişlerdir.

Schröder ve ark.<sup>59</sup>, yine emülsiyon polimerizasyonu yöntemini uygulayarak kristalize karbohidrat küreleri hazırlamışlardır.

Lee ve ark.<sup>57</sup> tarafından yapılan bir çalışmada, suda çözünmeyen etken maddeler için mikrosüspansiyon/emülsiyon yöntemi ile albumin küreleri elde edilmiştir.

Mikrokürelerin hazırlanması sırasında partikül büyüklüğüne etki eden faktörlerin incelendiği çalışmada Longo ve ark.<sup>40</sup>, polimerik dispersiyon maddeleri kullanarak hazırladıkları albumin mikrokürelerinin ortalama büyüklüğünün dispersiyon zamanı ve enerji girdisinin (input) fonksiyonu olduğunu ortaya koymuşlardır. Tomlinson ve ark.<sup>60</sup> 'da üretim sırasında mikroküre büyüklüğüne etki eden çeşitli faktörleri incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir.

TABLO 2: İnsan Serum Albumini Mikroküreleri Hazırlanması Sırasında Ortalama Çap Üzerine Etki Eden Faktörler<sup>60</sup>.

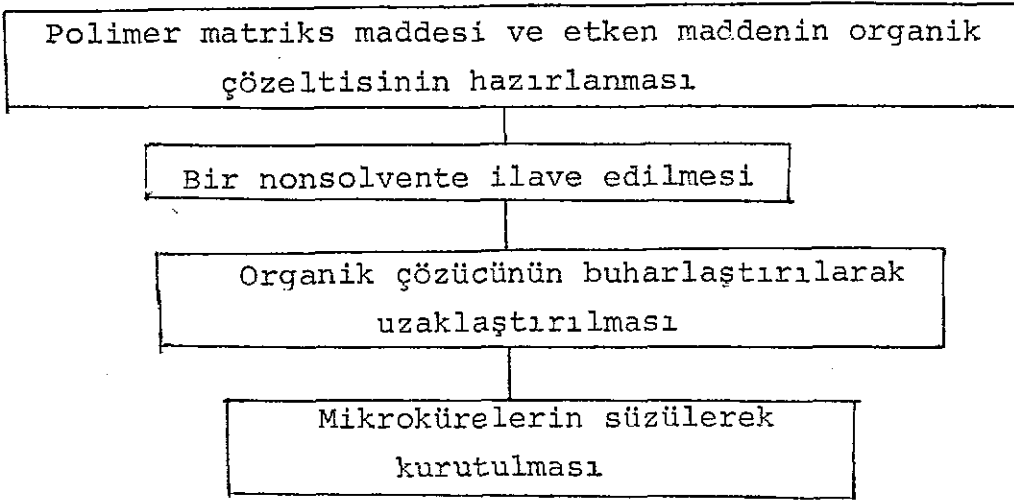
<u>Faktör</u>	<u>Değişiklik</u>	<u>Ortalama Çap</u>
Yağ vizkozitesi	azaltıldığında	büyür
Yağ miktarı	artırıldığında	büyür
Protein miktarı	artırıldığında	büyür
Sulu faz	artırıldığında	büyür
Karıştırma hızı	artırıldığında	küçülür
Yüzey aktif	ilave edildiğinde	etki görülmez



### I.1.3.2. Organik Çözücüden Faz Ayrılması Yöntemi

Polimer matriksin ve etken maddenin organik çözeltilisinden hareketle mikroküre hazırlanmasına dayanan bu yöntem şematik olarak Tablo 3'de gösterilmiştir<sup>36,37,60,61</sup>.

TABLO 3: Organik Çözücüden Faz Ayrılması ile Mikroküre Hazırlama İşlemi



Wakiyama ve ark.<sup>36</sup> organik çözücü olarak metilen klorür nonsolvent olarak da %1-2 lik jelatin veya sodyum aljinat çözeltilisi kullanarak bu yöntemle göre dibukain taşıyan polilaktik asid mikroküreleri hazırlamışlardır.

### I.1.4. Matriks Maddeleri

Yaklaşık 25 civarında madde, mikroküre hazırlanmasında kullanılmak üzere matriks maddesi olarak önerilmiştir (Tablo 4). Aralarında lipoproteinler, albumin, jelatin, nişasta, etil selüloz, agar ve polialkilsiyanoakrilatın bulunduğu bu matriks maddelerinin bir kısmında toksik özellik olmadığı gösterilmiş, diğerlerinde ise farzedilmektedir<sup>17,25,57,62</sup>. Toksisite

yanında dikkat edilmesi gerekli en önemli özellik biyolojik sistemde degradasyondur<sup>20,57,63,64</sup>.

Örneğin,

Matriks maddesi olarak kullanılan poliakrilamid ve polisiyanoakrilatın biyolojik olarak parçalanabilme özelliği uygun olmadığında bu iki madde poliakrildekstran ve polialkilsiyanoakrilat şeklinde modifiye edilmiştir. Bu türevler ile hazırlanan taşıyıcı sistemlerin biyolojik yarılanma ömürlerinin öncekine göre daha kısa olduğu gösterilmiştir<sup>9,26,65,66</sup>. Ayrıca şilomikronlar, düşük ve yüksek dansiteli lipoproteinler gibi matriks maddeleri organizma tarafından kolay tolere edilmekte ise de, bu maddelerden oluşan 0,1-2 µm büyüklüğündeki kolloidal partiküllerin biyolojik akıbetleri farklıdır<sup>67</sup>. Dolayısıyla teknolojik açıdan mikroküre imalinde uygun iseler de yeterli veri olmadığından pek fazla güvenilememektedir<sup>26</sup>.

Hem endojen hem de eksojen kaynaklı daha birçok madde matriks maddesi olarak öne sürülmüş ise de (Tablo 4) bunların arasında serum albumini özellikleri açısından en uygunu olarak kabul edilmektedir<sup>26,48</sup>. Albumin mikrokürelerinin immunolojik reaksiyon gösterdiğinin gözlenmiş olmasına karşın, kan plazmasında çözünebilen insan serum albumininin dolaşım için doğal bir taşıyıcı olması, in vivo olarak parçalanabilmesi<sup>32</sup>, toksisitesinin çok düşük olması<sup>17,57</sup> ve hazırlanan mikrokürelerin büyüklük dağılımının kolay kontrol edilebilmesi nedeniyle mikroküre imalinde özel bir yeri vardır<sup>19,52,68</sup>. Serum albumini ilk defa Kramer<sup>69</sup> ila Kramer ve Burnstein<sup>55</sup> tarafından bakteriyel ve fungal RES enfeksiyonlarının tedavisi

ile ayrıca sitostatik ilaçların uygulanması amacıyla ilaç taşıyıcıları olarak kullanılmıştır. Daha sonra birçok araştırmacı farklı etken maddeler kullanarak albumin mikroküreleri hazırlamışlardır (Tablo 4).

#### I.1.5. Mikrokürelerin Radyoaktif Olarak İşaretlenmesi

Mikrokürelerin organizmaya verildikten sonra hangi organ veya dokulara dağıldığını izleyebilmek amacıyla radyoaktif maddelerle işaretleme işlemi uygulanmıştır<sup>21,49,51,100</sup>.

Mikrokürelerin radyoaktif olarak işaretlenmesinde genellikle iki yol izlenmiştir. Bunlar; mikroküre hazırlama sırasında radyoaktif madde ilavesi ile işaretleme<sup>23,25,29,30,39,43,47,48,49,51,69</sup> ve mikroküre hazırlandıktan sonra farklı yöntemlerle işaretlemedir<sup>17,18,19,21,37,92,100,101,102</sup>.

Mikrokürelerin işaretlenmesi için genellikle  $^{125}_{51}\text{I}$  21, 25,48,49,  $^{14}_6\text{C}$  39,43,69,  $^{14}_{58}\text{Ce}$  11,37,102,  $^{99m}_{43}\text{Tc}$  17,18,19,21, 100,101,  $^{113m}_{51}\text{In}$  21,101,  $^3_1\text{H}$  29,51,  $^{131}_{53}\text{I}$  30,92 gibi radyoaktif maddeler kullanılmıştır.

Araştırmamızda uygulanan işaretleme işlemlerinde  $^{99m}_{43}\text{Tc}$  kullanılmıştır.  $^{99m}_{43}\text{Tc}$ , fiziksel özellikleri bakımından uygunluğu nedeniyle nükleer tıpta rutin teşhis ve araştırmalarda tercih edilen bir işaretleme maddesidir.  $^{99m}_{43}\text{Tc}$ , tabiatta bulunmayan yapay olarak reaktörde elde edilen, yarılanma ömrü (T 1/2) 6 saat, gama enerjisi (E $\gamma$ ) 140 KeV olan bir geçiş elementidir. Geçiş elementi olması nedeniyle kompleks oluşturarak moleküllere bağlanır. Albuminin işaretlenmesi sıra-

TABLO 4: İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Tasarımlanmış Mikroküreler

Matriks Maddesi	Çapı( µm)	Tasarımlanan Kullanım Amacı	İçerisine Yerleştirilen Etken Madde	Kaynaklar
Şilomikronlar	0,1-0,5	-	Faktör VIII	70
Düşük dansiteli lipoprotein	0,017-0,025	Neoplastik hücrelere dağıtım	Metotreksat, Antikanser maddeler	67 71,72
Yüksek dansiteli lipoprotein	0.007-0.012	i.v.yolla böbreküstü bezlerine ve ovaryumlara dağıtım	Gram-negatif lipopolisakkarit	67,73
Polialkilsiyanoakrilat	0.2	i.v. yolla lizozomotropik dağıtım	Antimitotikler(örn. daunorubisin) aktinomisin D doksorubisin	65 66 9
Poliisobütilsiyanoakrilat	0.22	Dışarıdan magnetik alan uygulanarak hedeflendirilebilen dağıtım	<sup>3</sup> H-daktinomisin	74
Poliamid	60-120	Oral yolla sakkaroz intoleransı için	L-invertaz	75
Poliakrilamid	0.3,18,36	i.p.,i.v. yolla akut lösemi için	L-asparaginaz	41
	0.25-3	i.m.,s.c.yolla enzim antikor etkilerindeki azalma için	L-asparaginaz	44
	0.7	i.v.yolla enzim bozukluğu tedavisinde lizozomotropik dağıtım	Enzimler(örn,L-asparaginaz)	41
	130-630	Oral yolla kontrollü dağıtım	Tetrasiklin hidroklorür, teofilin	76
DL-poliilaktik asid	25-75	s.c.yolla lokal anestesiklerin dağıtımı	Dibukain,tetrakain	36,77

Matriks Maddesi	Çapı (µm)	Tasarımlanan Kullanım Amacı	İçerisine Yerleştirilen Etken Madde	Kaynaklar
	125	Subdermal yolla antimalarial maddelerin uygulanması	Kinazolin analogları	78
Poliakrolein	1-3	İmmunoglobulinleri bağlayarak hücre işaretlenmesi	-	79,80
Poliakrildekstran	-	Proteinin hedeflendirilebilen dağıtımı	Proteinler	35
Poliakrilik nişasta	0.5	Protein veya etken maddelerin hedeflendirilebilen dağıtımı	Proteinler	89
Sülfonik iyon değiştirici reçine	38-297	Oral yolla antihelmintik madde dağıtımı	Levamisol	90
Etil selüloz	225	Sitostatik maddelerin arteriyel kemoembolizasyon yoluyla karaciğer ve böbreklere dağıtımı	Mitomisin C	91
Modifiye selüloz	40-160	i.v. yolla akciğerlere etken madde dağıtımı	Metotreksat	92
Jelatin	1.6,1.9	Sitostatik etken maddelerin lenfotropik dağıtımı için mikroküre/yağ emülsiyonu olarak	5-fluorourasil	5,6
	-	Sitostatik etken maddelerin lenfotropik dağıtımı için mikroküre/yağ emülsiyonu olarak	Bleomisin	93
Jelatin ile ilaç-dekstran konjugatı	0.28,14.9	i.v. yolla akciğerlere dağıtım	Mitomisin C/dekstran konjugatı	30
Polimerkaptal	0.8	Oral veya perfüzyon yoluyla ağır metal zehirlemesinin tedavisi	Merkaptal	81
Hemoglobin	5-60	Oksijen taşıyıcı fonksiyonu nedeniyle	Hemoglobin	82
Polistiren	3-25	Topik olarak prekorneal uygulama	-	83
Agaroz	-	Tümör dokusu içine enjeksiyon	Mitomisin C	84

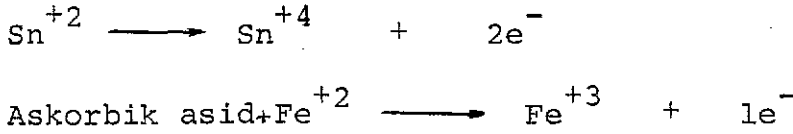
Matriks Maddesi	Çapı (µm)	Tasarımlanan Kullanım Amacı	İçerisine Yerleştirilen Etken Madde	Kaynaklar
Nişasta <sup>x</sup>	10	i.v.yolla verildikten sonra dışarıdan magnetik alan uygulanarak tümör dokusuna hedeflendirme	Model bileşikler olarak albumin ve etanolamin	47
Nişasta	43	Radyasyon kuruyucusu olarak geçici barsak hipoksisi için	Etken madde ile birlikte kullanılmamaktadır.	85
Nişasta(Spherex <sup>R</sup> )	40	Sitostatik etken maddelerin intraarteriyel olarak birlikte uygulanması	5-Fluorourasil Aktinomisin D Mitomisin C (Etken maddeler taşıyıcı içine yerleştirilmeden, ayrı olarak verilmiştir.)	63,86 32,87 88
Albumin	0.1-1	İmmunosüpresiflerin i.v. dağıtımı	Merkaptopurin-8- <sup>14</sup> C hidrat	55,69
	0,66	RES'e i.v. dağıtım	5-Fluorourasil- <sup>3</sup> H	29,51,62,94
	2-12	Genel ilaç taşıyıcıları olarak uygulama	-	40
	7 ; 15	i.v. yolla anfizem tedavisi	Lökosit elastaz inhibitörü	95
	100-200	i.m.,veya s.c. yolla depo etki sağlama	Progesteron	57
	45	Sitostatik maddelerin arteriyel kempembolizasyon yoluyla tümör dokusuna dağıtımı	Mitomisin C	56
	10-40	Radyoaktif işaretli mikroküreleri intraarteriyel yolla etken madde ile kombine halde kullanılarak tedavinin desteklenmesi	Yttrium 90	96
	1835	Oral yolla kontrollü dağıtım	Sulfametizol	38

Matriks Maddesi	Çapı (µm)	Tasarımlanan Kullanım Amacı	İçerisine Yerleştirilen Etken Madde	Kaynaklar
Albumin <sup>x</sup>	1-2	Dışarıdan magnetik alan uygulayarak tümörlere hedeflendirilmiş dağıtım	Dokсорubisin	23,25,49,53, 54,57,98
	1	İmmunoglobulinleri bağlayarak hücre sepaşasyonu	Stafilokokal protein A	24
	0.5-2.5	Intraarteriyel yolla farklı anatomik bölgelere genel etken madde dağıtımı	-	99

(x) : Bu matriks maddelerine magnetit ilave edilerek magnetik özellik kazandırılmıştır.

sında, albumin molekülündeki amin grupları ile kompleks bir bağ oluşur. Bağlanma oldukça kararlıdır<sup>103</sup>.

Literatürde mevcut olan demir<sup>103</sup> ve kalay<sup>104</sup> ile bağlama yöntemlerinden, daha yüksek bir işaretleme yüzdesine ulaşılabildiğinden çalışmamızda demir ile bağlama yöntemi kullanılarak mikroküreler işaretlenmiştir. <sup>99m</sup>Tc, en kararlı halde +7 oksidasyon kademesi olan perteknetat ( $TcO_4^-$ ) iyonu olarak bulunmaktadır. Kompleks yapabilmesi için +4 veya +5'e indirgenmesi gereklidir. Bu amaçla tek başına  $Sn^{+2}$  veya askorbik asitle birlikte  $Fe^{+2}$  kullanılmaktadır. Burada Tc'un +4'e indirgenmesi aşağıdaki mekanizma ile olmaktadır :



Askorbik asid +3'e yükseltgenen demiri tekrar +2'ye indirgeyerek sürekli olarak Tc'un +4'e indirgenmesini ve böylece kararlı bir bağlanma sağlamaktadır<sup>103</sup>.

#### I.1.6. Hedeflendirmede Mikrokürelerin Kullanılması

Bir etken maddenin hedeflendirilmesindeki nedenler Tablo 5'de gösterilmiştir<sup>26</sup>.

Kolloidal partiküllerin kullanılmasıyla sağlanan hedeflendirme ikiye ayrılmaktadır<sup>26,105,106</sup>, bunlar:

- 1) Pasif hedeflendirme
- 2) Aktif hedeflendirme



TABLO 5: Hedeflendirme Nedenleri<sup>26</sup>

## Farmasötik yönden:

- Etken maddenin klasik formülasyonlardaki dayanıksızlığı
- Çözünürlük sorunu

## Biyofarmasötik yönden:

- Düşük absorpsiyon
- Membrana aşırı bağlanma
- Biyolojik dayanıksızlık

## Farmakokinetik/farmakodinamik yönden:

- Yarılanma ömrünün kısa olması
- Dağılma hacminin geniş olması
- Spesifik özelliğın düşük olması

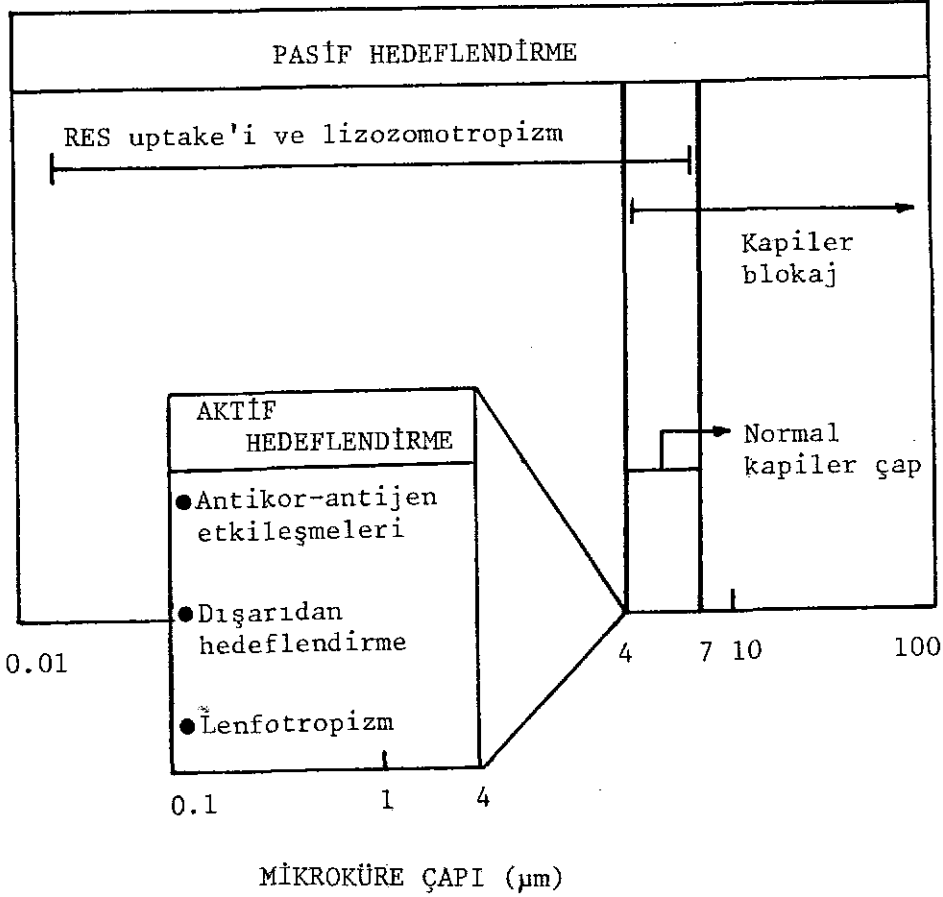
## Klinik yönden:

- Terapötik indeksin düşük olması
- Anatomik ve hücresele engeller

## Ticari yönden:

- İlacın takdimi

Mikroküreler pasif veya aktif hedeflendirme sağlamak amacıyla tasarlanmaktadır<sup>23,24,49</sup>. Şekil 2'de mikrokürelerin hedeflendirilebilen ilaç dağıtım sistemleri olarak kullanılmasının mantıksal açıklaması görülmektedir<sup>105</sup>.



Şekil 2: İ.v. enjeksiyondan sonra mikroküre büyüklüğü ile biyolojik hedeflendirme arasındaki ilişki<sup>105</sup>.

#### I.1.6.1. Pasif Hedeflendirme

İn vivo doğal dağılım modelinden yararlanılarak i.v. olarak verilen ilaç taşıyıcısının hedeflendirilmesinin sağlanması esasına dayanır<sup>26,106</sup>. Örneğin, herhangi bir etken

maddenin akciğerlere dağıtımını düşünülüyorsa, kapiler blokajdan yararlanılarak büyük mikroküreler pasif olarak akciğerlere hedeflendirilebilirler<sup>30</sup>. Ayrıca RES'in yabancı partikülleri kandan uzaklaştırma yeteneğinden yararlanılarak, etken madde yüklü taşıyıcıların makrofajlara pasif olarak hedeflendirilmesi sağlanabilir<sup>107</sup>.

Intravasküler enjeksiyondan sonra mikrokürelerin biyolojik olarak hedeflendirilmesinde başlıca şu yaklaşımlar sözkonusudur;

- 1) Yaklaşık 0,1-2,0 µm büyüklüğündeki partiküller intravenöz, intraarteriyel veya intraperitoneal olarak enjekte edildiğinde RES'in makrofajları tarafından kan dolaşımından hızla uzaklaştırılırlar ve sonunda karaciğerin Kupffer hücrelerinin lizozomları içinde lokalize olurlar. 50 nm den daha küçük partiküller ise karaciğer endotelyumunun açıklıklarını geçerek ve belki de lenf yolu ile taşınarak dalak, kemik iliği ve büyük bir olasılıkla da tümör dokusunda toplanmaları mümkün olabilir<sup>26</sup>.
- 2) 7-12 µm den daha büyük partiküller intravenöz olarak verildiğinde akciğerler tarafından mekanik filtreye uğrarlar<sup>30</sup>. Oysa 2-12 µm büyüklüğündeki partiküller, akciğerlerin yanısıra karaciğer ve dalağın kapiler ağı içerisinde de hapsedilmektedirler<sup>102</sup>.

3) 12  $\mu\text{m}$  den daha büyük kolloidal partiküller eğer intraarteriyel yolla verilecek olursa, karşılaştıkları ilk kapiler yatakta tutulurlar<sup>107</sup>. Böylece karaciğer veya böbrekler için birinci derece, tümörlü organlar için de ikinci derece hedeflendirme sağlanabilir<sup>108</sup>.

Tümör taşıyan organ ile tümörün kapiler ağları arasındaki kalitatif ve kantitatif farklılıklar nedeniyle tümörlü organlar için ikinci derece hedeflendirmeye ulaşılabilmektedir<sup>109</sup>. Çeşitli çalışmalarda bu durumdan yararlanılarak mikrokürelerin büyüklüğü ve/veya uygulama yolları değiştirilerek amaca yönelik bir hedeflendirme sağlanmaktadır<sup>105</sup>. Örneğin, 15 $\mu\text{m}$  den daha büyük mikrokürelerin mesenterik arter, portal ven veya renal artere enjekte edilmeleri yine sırasıyla mide, karaciğer veya böbreklerde tamamen tutulmalarına neden olmaktadır<sup>26</sup>.

Etken madde taşıyan mikropartiküllerin seçici bir arteriyel kateter ile enjeksiyonuna kemoembolizasyon adı verilmektedir<sup>110,111</sup>. 200-300  $\mu\text{m}$  gibi aşırı büyüklüğe sahip ve antikanser etken madde taşıyan mikroküreleri intraarteriyel yolla uygulayan Kato ve ark.<sup>91</sup>, kemoembolizasyon sonucu dengeli bir ilaç etkisi sağlayarak terapötik etkiyi artırmışlardır. Daha sonra buna benzer çalışmalar yapılmıştır<sup>111,112</sup>.

#### 1.1.6.2. Aktif Hedeflendirme:

Taşıyıcı bir partikülün büyüklüğü ve yüzey özelliklerinin

dolayısıyla bu partikülün organizmadaki doğal dağılım modelinin değiştirilmesi sonucu spesifik hücrelere, dokulara veya organlara yönlendirilmesi esasına dayanmaktadır<sup>32,33,52,106</sup>. Vücutta, bazı yabancı madde veya partikülleri fagosite etmek amacıyla işaretlemeye ve belirtmeye yarayan bir mekanizma mevcuttur. Bu gibi maddeler önce opsonin denilen bir çeşit globulin molekülü ile birleştirilir. Opsoninleşmiş partiküllere fagosit hücreler kolaylıkla yapışır ve onları çabucak fagosite ederler<sup>107</sup>. Bu nedenle opsoninleşme ve dolayısıyla partikülün makrofajlara yapışması engellenerek aktif bir hedeflendirme sağlamak amacıyla yapılabilecek modifikasyonlar; hidrofilik kaplama maddelerinin, hücreye özgü ligandların ve partikül-monoklonal antikör konjugatlarının kullanılmalari ile karaciğerin Kupffer hücrelerinin bloke edilmesi olarak sıralanabilir<sup>106</sup>.

Hedeflendirmenin pasif tabiatını değiştirerek mikrokürelerle aktif hedeflendirme oluşturmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunu sağlamanın,

- a) Dışarıdan magnetik alan uygulanması,
- b) Mikrokürelerin kaplanması,
- c) Lenfotropizm olmak üzere başlıca üç yolu olduğu bildirilmektedir(Şekil 2)<sup>26</sup>.

- a) Dışarıdan magnetik alan uygulanması

Widder ve ark.<sup>23,24,25,49,53,54,98,113</sup>, magnetik partiküller içeren 1-2  $\mu$ m çapında albumin mikrokürelerini kullanarak bu tip hedeflendirmeye öncülük etmişlerdir. Hazırlanan

bu magnetik mikrokürelere enjekte edildikten sonra dışarıdan iki boyutlu magnetik alan uygulanarak vücudun istenen bölgesinde toplanmaları sağlanmıştır. Mikrokürelere bu şekilde magnetik özellik kazandırılarak hem daha küçük dozlarda uygulanma olanağı doğmuş, hem de diğer doku ve organlarda birikmeleri önlenerek etken maddenin sadece hedef bölgede terapötik düzeylere ulaşması sağlanmıştır.

Senyei ve ark.<sup>49,97</sup> tarafından doksorubisin taşıyan magnetik albumin mikrokürelere hazırlanmış ve sıçanların kuyruğu dört eşit parçaya ayrılarak üçüncü bölge hedef alan olarak kabul edilmiştir. Hedef olarak seçilen bu kuyruk bölgesine dışarıdan magnetik alan (mıknatıs) uyguladıklarında enjekte edilen mikrokürelere sadece bu bölgede toplamayı başarmışlardır.

İnsanların akciğerlerinde ve karaciğerindeki ferromagnetik kontaminasyonu ölçmek için yapılan bir çalışmada da dışarıdan magnetik alan uygulanmıştır<sup>114</sup>.

Yine Senyei ve ark.<sup>49</sup> tarafından son yıllarda yapılan bir çalışmada ise düşük dozda doksorubisin içeren magnetik albumin mikrokürelere in vivo kinetikleri incelenmiş ve enjeksiyondan 60 dakika sonra etken maddeye diğer hiçbir organda rastlanmadığı halde tümörde yüksek düzeylere ulaştığı gözlenmiştir. Bu konuda çalışan diğer araştırmacı grupları ise, 1-7  $\mu\text{m}$  lik albumin<sup>23,24,25,49,53,54,97,98,99</sup>, 10  $\mu\text{m}$  lik nişasta<sup>47</sup> ve 0,22  $\mu\text{m}$  lik polialkilsiyanoakrilat<sup>74</sup> mikrokürelere içine magnetik partiküller yerleştirmişlerdir.

b) Mikrokürelerin kaplanması

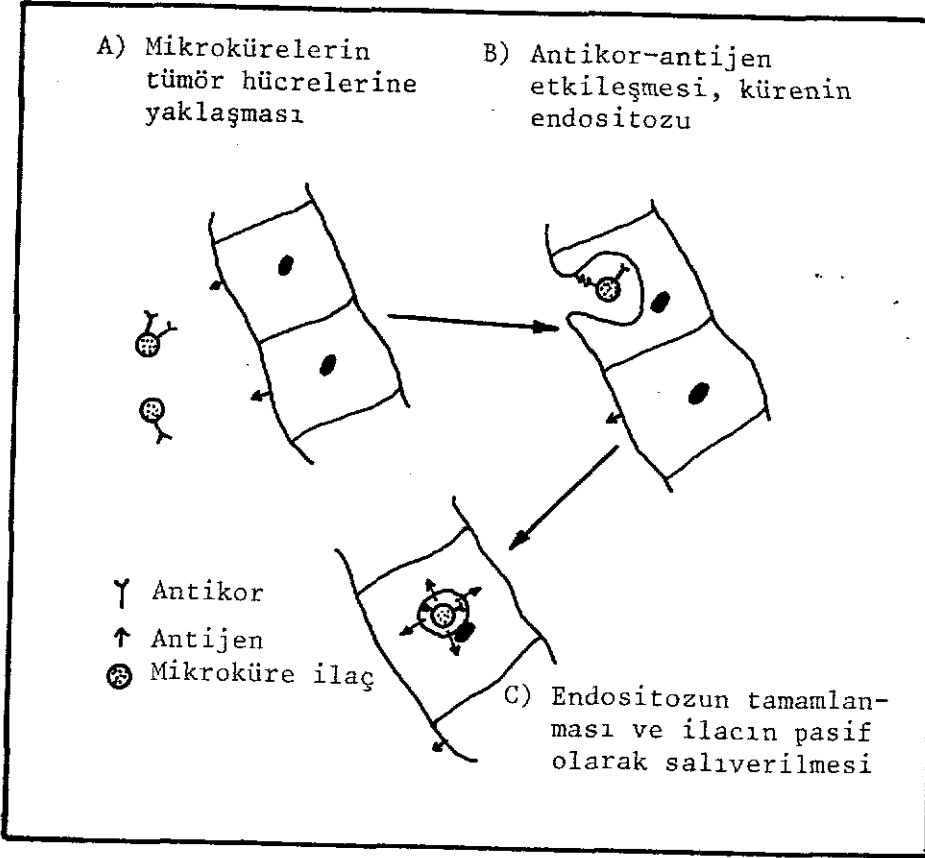
Mikrokürelerin yüzeyleri, yüzey yüklerini, adhezif özelliklerini veya immün yanıt karakteristiklerini değiştirecek bir madde ile kaplanarak biyolojik sistemde kontrollü biçimde hareket etmeleri sağlanabilmektedir<sup>22,26,23</sup>.

Bunların arasında immün yanıt karakteristiklerini değiştirme işlemi tasarımıda, en uygun seçenek olarak gösterilmektedir<sup>26,105</sup>.

Bu amaçla mikrokürelerin yüzeyleri tümör hücresinin yüzeyinde bulunan, antijene özgü antikorlar ile kaplanmaktadır<sup>79,80</sup>.

Şekil 3'de antikor ile kaplanmış mikroküreler kullanılarak intraselüler ilaç dağıtımının sağlanmasında öne sürülmüş olan mekanizma görülmektedir<sup>105</sup>.

Tomlinson<sup>26</sup> in vitro çalışmaların antikor ile kaplanmış mikrokürelerin tümör hücreleri ile birleşebileceğini gösterdiğini ancak in vivo çalışmaların bu konuda ortaya kesin bir kanıt koyamadığını öne sürmüştür. In vitro ve in vivo çalışmalar arasında görülen bu çelişkili durum, enjeksiyon sırasında muhtemelen mikroküre yüzeyine kan bileşenlerinin adsorbe olmaları sonucu antikor karakterinin azalması veya antikor-antijen etkileşmesi arasında denge oluşarak RES uptake'nin kolaylaşması nedeniyle ortaya çıkmaktadır<sup>26,105</sup>. İlaç-antikor kompleksleri hücre zarının determinantlarına bağlandığında endositoz kolaylaşmaktadır<sup>109</sup>. İlaç-mikroküre-antikor sistemlerinin dağıtımında bu özellikten yararlanılabi-



Şekil 3: Antikor ile kaplanmış mikrokürelerin hücre içine geçiş mekanizması<sup>105</sup>.

lir ancak mikroküre şeklinde verilen bazı ilaçların ekstraselüler olarak aktif olabildikleri saptandığından bu tip ilaçlar için mikrokürelerin mutlaka endositoza uğramaları gerekmektedir<sup>26,105,115</sup>.

Mikrokürelerin yüzey yüklerinin önemini ortaya koyan çeşitli görüş ve çalışmalar bulunmaktadır. Mikrokürelerin hidrofobik özellikleri konusunda Widder ve ark.<sup>23</sup>, bir hipotez öne sürmüşlerdir. Bir su/yağ emülsiyonunda moleküllerin hidrofobik bölgeleri tercihan dıştan yağa doğru yönelecekleri gibi, yağ-su ara yüzeyinde sıralanmış olan albumin



moleküllerinin konformasyonunda da değişiklik olabilir. Böylece mikroküreler sulu bir ortama geçtiklerinde belirli bir süre için şekillerini korumalarına izin veren geri dönüşümsüz hidrofobik bir kabuk veya çeper oluşmaktadır. Albumin mikrokürelerinin yüzeylerini hidrofilik hale getirmek amacıyla çalışan Longo ve ark.<sup>40</sup>, albumini glutaraldehid ile çapraz bağlayarak mikrokürelerin yüzeylerinde serbest aldehid grupları oluşturmuşlardır. Kumakura ve ark.<sup>79,80</sup> da poliakrolein mikrokürelerinin yüzeylerinde aynı şekilde fonksiyonel aldehid grupları oluşturmuşlardır. Böylece bu gruplara aminoalkol bağlanarak hidrofilik özelliğin artırılabilceği, enzim, antikor veya başka bir protein ligandının bağlanmasının kolaylaşacağı ayrıca fonksiyonel amino grubu taşıyan ilaçların da kovalan olarak bağlanabileceği ile sürülmüştür<sup>40,79,80</sup>.

Mikrokürelerin yüzeylerine hidrofilik özellik kazandırıldığında bu taşıyıcıları karaciğerin fagositik hücreleri yerine diğer bölgelere göndermek mümkün olmaktadır<sup>107</sup>. Bu amaçla mikrokürelerin yüzeyleri hidrofilik polimer (noniyonik yüzey aktif) olan poloksamerler ile kaplanmaktadır<sup>33,116</sup>.

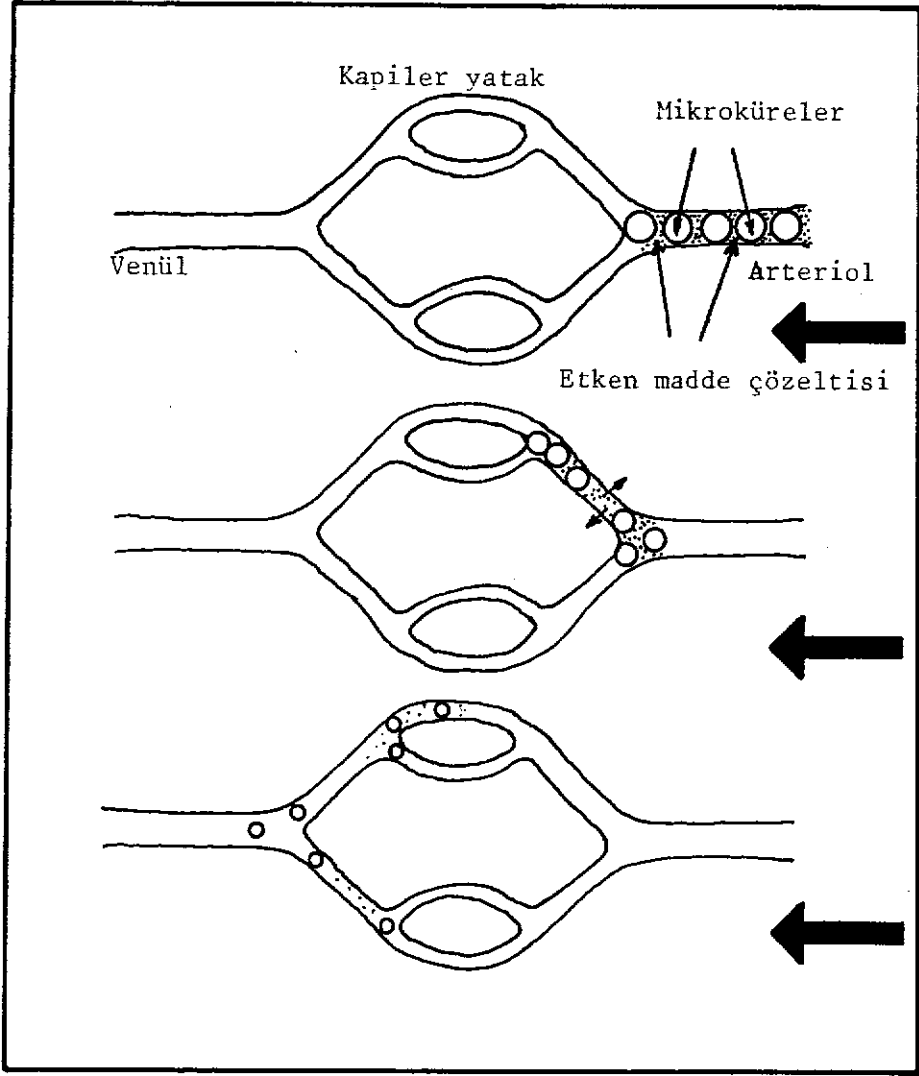
Albumin mikroküreleri hazırlanırken uygulanan denatürasyon sıcaklığı ile bağıntılı olarak i.v. enjeksiyondan sonra mikrokürelerin vücutta dağılılacakları bölgeler de değişmektedir. Sugibayashi ve ark.<sup>51,62</sup> tarafından yapılan çalışmada, 100,150 ve 180°C sıcaklık uygulanarak mikroküre hazırlanmış, 180°C de hazırlananların yüksek fagositik etki nedeniyle karaciğerde, 100 ve 150°C de hazırlananların ise karaciğerin yanısıra akciğerlerde de tutuldukları gösterilmiştir.

### c) Lenfotropizm

Cerrahi müdahale ile tümörü çıkarılan herhangi bir hastada en sık rastlanan iki olay, yeniden primer tümör oluşumu ve metastatik yayılmadır<sup>93</sup>. Bu olaylarda etkin rolü olan lenfatik sistem içine ilacın girmesi, sistemik dozlama ile mümkün olamadığından özellikle lenf nodüllerine ilaç taşınması amacıyla lenfotropik jelatin mikroküre sistemi geliştirilmiştir<sup>5,6,93</sup>. Bu taşıyıcı sistem bleomisin-jelatin mikroküresi/yağ emülsiyonu şeklinde hazırlanarak kullanıldığında, serbest bleomisin etkili olamazken söz konusu taşıyıcı sistem ile oldukça iyi sonuçlar alınmıştır<sup>93</sup>. Aynı amaçla etken madde olarak 5-florourasil kullanılarak da jelatin mikroküresi/yağ emülsiyonu hazırlanmıştır<sup>5,6</sup>. Benzer şekilde anti-kanser etken madde taşıyan albumin mikroküresi/yağ emülsiyonu hazırlanarak lenfatik dağıtım sağlanmıştır<sup>117</sup>.

Son yıllarda kanser kemoterapisi alanında mikroküreler ile değişik bir uygulamaya gidilmektedir. Uygun büyüklükteki mikroküreler hedef organa intraarteriyel olarak enjekte edildiğinde arteriollerde tutulacak ve kan akımında geçici bir blokaja veya azalmaya neden olacaklardır(Şekil 4)<sup>118</sup>. Bu görüşten hareketle yapılan çalışmalarda yaklaşık 40-45  $\mu$ m büyüklüğe sahip, biyolojik sistemde hızla parçalanabilen (10 dakika ile 1 saat arasında) nişasta mikroküreleri ile hazırlanan süspansiyonda antikanser etken madde çözündürüldükten sonra birlikte intraarteriyel yolla verilerek tümörlü organın arteriollerinde geçici bir blokaj oluşturulmuştur. Böylece birlikte verilen etken maddenin hedef bölgede kalış

süresi uzatılmış ve konsantrasyon gradyanı korunarak büyük bir absorpsiyona olanak sağlanmıştır<sup>32,38,53,86,87,88</sup>. Bu olayın mantıksal açıklanması Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4: Nişasta mikroküreleri ile prekapiler arteriol blokajı ve birlikte verilen ilacın buradan çıkışı<sup>88</sup>.

### I.1.7. Etken Maddenin Salıverilmesi

#### I.1.7.1. Salıverilmeyi İncelemekte Kullanılan İn Vitro Yöntemler

Mikrokürelerden etken madde salıverilmesini incelemek için genellikle iki in vitro yöntem uygulanmaktadır, bunlar 37°C de inkübasyon ve dinamik diyaliz yöntemleridir.

##### a) 37°C de Inkübasyon Yöntemi

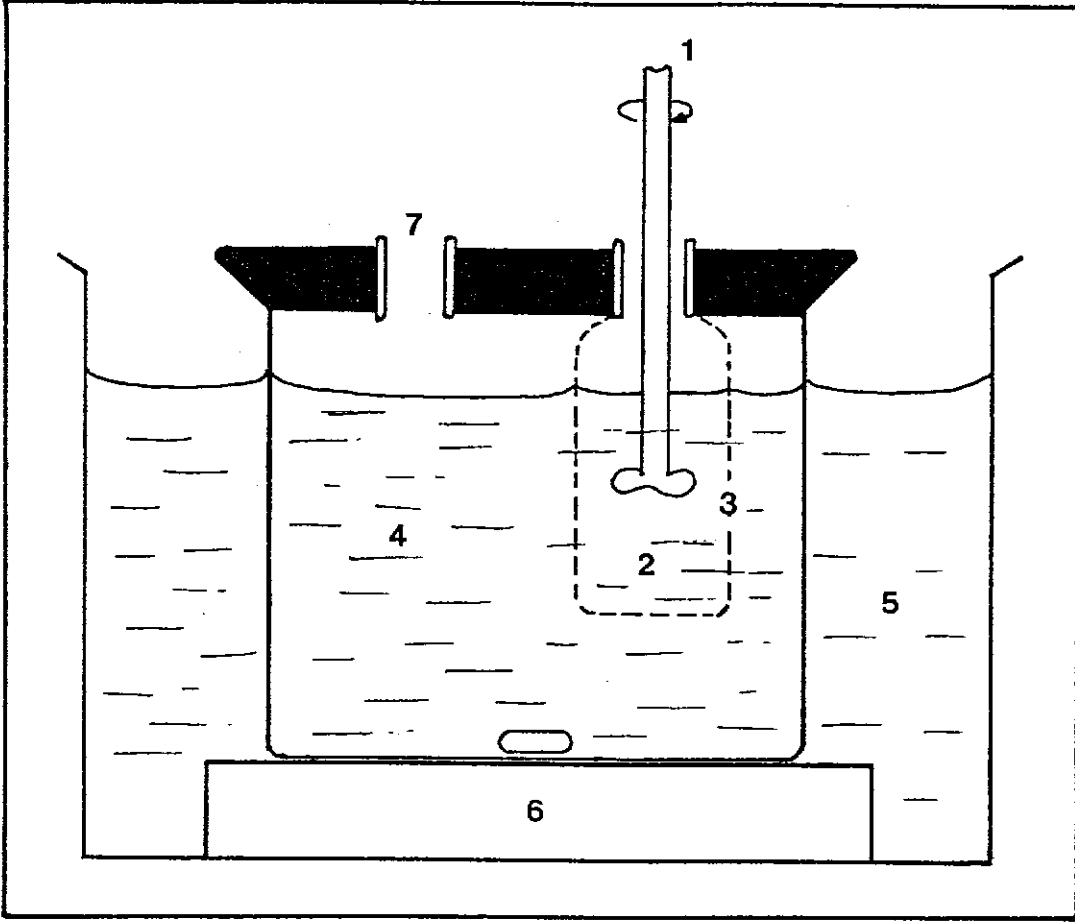
Mikrokürelerden etken madde salıverilmesi en fazla bu yöntemle incelenmiştir. Genellikle 37°C de ve pH 7.4 civarındaki bir tampon çözelti içerisinde mikroküreler hafif bir yatay çalkalama uygulanarak inkübasyona bırakılmakta; salıverilen etken madde miktarını saptamak için belirli aralıklarla örnekler alınıp, süzülerek ölçüm yapılmaktadır<sup>23,30,36,77</sup>.

##### b) Dinamik Diyaliz Yöntemi

Bu yöntem, periton içine verilen mikrokürelerden etken maddenin salıverilmesini in vitro şartlarda incelemek amacıyla kullanılmıştır<sup>56,62,94,118</sup>. Ayrıca mikroküre/yağ emülsiyonlarından etken madde salıverilmesi de bu yöntemle incelenmiştir<sup>5,119</sup>. Şekil 5'de görülen böyle bir sistemde mikroküre süspansiyonu selüloz zar içine konur ve buradan dış ortama geçen etken madde miktarı yine dış ortamdan belirli aralıklarla örnekler alınarak ölçülür<sup>62</sup>.

#### I.1.7.2. Salıverilme Kinetiği

Mikrokürelerin hazırlanmaları sırasında etken madde taşıyıcının içine hapsedildiği gibi yüzeye de adsorbe olabilir



Şekil 5: Etken madde salıverilmesini incelemek amacı ile kullanılan dinamik diyaliz sistemi<sup>62</sup>

- |                           |                              |
|---------------------------|------------------------------|
| 1) Mekanik karıştırıcı    | 5) Su banyosu                |
| 2) Mikroküre süspansiyonu | 6) Magnetik karıştırıcı      |
| 3) Selüloz zar            | 7) Örneklerin alındığı delik |
| 4) Tampon çözeltisi       |                              |

veya kovalan olarak bağlanabilir<sup>69,95</sup>.

Etken maddenin mikrokürelerden salıverilmesini gerçekleştiren olaylar; yüzey erozyonu, total küre dezentegrasyonu, mikroküre hidrasyonu (şişme), etken maddenin difüzyonu ve desorpsiyonu, iyon değiştirici reçineler için sözkonusu olan partikül difüzyonu ve filtrasyonu olarak sıralanabilir<sup>26</sup>.

İyon değiştirici reçineler dışında monolitik mikrokürelerden etken maddenin in vitro pasif salıverilmesi karakteristik olarak iki fazlıdır. Başlangıçta patlama etkisi (burst effect) nedeniyle görülen büyük miktarda ve hızlı bir salıverilmenin ardından birinci dereceye uyan daha yavaş bir salıverilme olmaktadır<sup>49,60,84,120,121</sup>. Oysa Yoshioka ve ark.<sup>30</sup>, dekstran konjugatı içeren mikroküre ve nanokürelerden etken madde salıverilmesinin önemli derecede yavaş ve tek üslü olduğunu göstermişlerdir.

Mikrokürelerden etken madde salıverilme profillerinin basit iki üslü fonksiyona uyduğu düşünüldüğünde Eşitlik 1 ile gösterilebilir<sup>60</sup>;

$$Q_t = Ae^{-\alpha t} + B e^{-\beta t} \quad \text{Eşitlik 1}$$

Burada;

$Q_t$  : t zamanında mikrokürelerin içinde kalan etken madde miktarı

A ve B : Sabite

$\alpha$  ve  $\beta$  : Hız sabiti

A, B,  $\alpha$  ve  $\beta$  etken madde salıverilmesini karakterize etmek amacıyla kullanılabilir.

Salıverilmenin heriki fazını da kontrol etmek mümkün ise de patlama etkisi çoğunlukla 5 dakika içinde tamamlanmaktadır<sup>23,38</sup>. Bu nedenle etken madde taşıyan mikrokürelerin karakteristiklerinde modifikasyonlar yapılarak etken madde salıverilmesinde terapötik olarak anlamlı değişmelerin sağlanması sadece salıverilmenin yavaş olan ikinci fazı için mümkündür<sup>60</sup>.

Benoit ve ark.<sup>122</sup>, progesteron taşıyan polilaktid mikrokürelerinden etken madde salıverilme kinetiklerini incelemiş ve mikrokürelerden çözünen bir etken maddenin desorpsiyon kinetiklerini, kinetik eşitlik çok kompleks olduğundan desorpsiyon eğrisinin farklı kısımları için geçerli olan ve güvenilirliği % 1 den daha iyi olan iki yaklaşıma indirgemişlerdir;

1) Eğrinin başlangıç kısmını kapsayan yaklaşım Eşitlik 2 ile ifade edilmiştir.

$$\frac{Q'}{W_0} = \left(\frac{Dt}{r^2\pi}\right)^{1/2} - 3 \frac{Dt}{r^2} \quad \text{Eşitlik 2}$$

Burada;

$Q'$  : t zamanında salıverilen etken madde miktarı

$W_0$  : Etken maddenin mikroküreler içindeki başlangıç miktarı

$D$  : Polimer içindeki etken maddenin difüzyon katsayısı

$r$  : Mikrokürelerin yarıçapı

Eşitlik 2,  $Q'/W_0 < 0,4$  olduğunda geçerlidir.

2) İkinci yaklaşım ise Eşitlik 3 ile ifade edilmiştir.

$$\frac{Q'}{W_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2} e^{-\frac{\pi^2 Dt}{r^2}}$$

Eşitlik 3 gerçekte birinci derece bir eşitliktir ve  $Q'/W_0 > 0.6$  olduğunda geçerlidir.

### 1.1.7.3. Salıverilmeyi Etkileyen Faktörler

Tomlinson <sup>26,105</sup>, mikrokürelerden etken madde salıverilmesini etkileyen faktörleri aşağıdaki şekilde sıralamıştır ;

- Etken maddenin mikroküre içindeki konumu
- Matriks maddesinin tipi ve miktarı
- Mikrokürenin büyüklüğü ve dansitesi
- Çapraz bağlamanın derecesi ve tabiatı
- Denatürasyon veya polimerizasyon işlemi
- Etken maddenin fizikokimyasal özelliği, molekül ağırlığı ve konsantrasyonu
- Mikroküre içinde yardımcı maddelerin varlığı
- Etken madde ile matriks maddesi arasındaki fizikokimyasal etkileşmeler



- Salıverilme ortamı ve şartları (örn.enzimlerin varlığı)

Eğer suda çözünen etken madde taşıyan mikrokürelere serum fizyolojik içinde 1-2 dakika ultrasonikasyon uygulanırsa salıverilmenin ikinci fazını etkilemeksizin patlama etkisi azaltılabilir<sup>60</sup>. Çünkü salıverilmenin ilk fazı (patlama etkisi), hazırlama sırasında etken maddenin mikroküre yüzeyine yapışması nedeniyle oluşmaktadır. Ultrasonikasyon sonucu mikroküre yüzeyine yapışmış olan etken madde uzaklaştırılarak patlama etkisinin şiddeti düşürülmektedir. Salıverilmenin ilk faza oranla daha yavaş olduğu ikinci fazda ise mikrokürelerin şişmesi, etken maddenin çözünmesi ve mikroküre matriksinin dışına difüzyonu sözkonusudur<sup>57,60</sup>.

Etken maddenin mikrokürelere salıverilmesini mikroküre büyüklüğü etkilemektedir<sup>26,30,105</sup>. Etken madde daha küçük taşıyıcı partiküllerden ikinci faz boyunca çok daha fazla ve hızlı bir şekilde salıverilmektedir. Bunun büyük bir olasılıkla iki nedeni vardır;

- a) Salıverilme olayı için kullanılabilir yüzey alanının büyümesi ve
- b) Etken maddenin dışarıya difüzyonu için gerekli olan mesafenin kısalmasıdır<sup>27</sup>.

Mikrokürelerin büyüklükleri artırıldığında ise ikinci fazdaki salıverilme yavaşlamaktadır<sup>60</sup>.

Lee ve ark.<sup>57</sup> 100 µm çapındaki albumin kürelerinden

in vitro etken madde salıverilmesini incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada matriks hidrasyonu sonucu kürelerin şişmesi nedeniyle başlangıçta bir gecikme süresi görülmüş, daha sonraki fazda ise difüzyon mesafesinin artması nedeniyle etken maddenin salıverilmesi yavaşlamıştır. Bu çalışmadan da görüldüğü gibi difüzyon, etken maddenin salıverilmesinde hız kısıtlayıcı bir basamaktır<sup>27,57</sup>.

Yoshioka ve ark.<sup>30</sup> mitomisin-C taşıyan jelatin mikroküreleri ve nanokürelerinden etken maddenin salıverilmesini incelemişler ve taşıyıcının büyüklüğüne bağlı olarak salıverilmenin nanokürelerde (280 nm çapındaki) mikrokürelere (14.9  $\mu$ m çapındaki) oranla çok daha hızlı olduğunu saptamışlardır. Ancak bu küreler içine mitomisin C-dekstran konjugatı yerleştirildiğinde artık taşıyıcı büyüklüğüne bağlı olmayan fakat etken maddenin hidrolitik yarıma ile dekstrandandan ayrılmasıyla hemen hemen aynı hızda yavaş bir salıverilme oluşmuştur. Etken maddenin dekstrandandan ayrılarak serbest hale gelmesinin, heriki küre için de hız kısıtlayıcı bir basamak olduğu düşünülmüştür.

Mikrokürelerden etken maddenin salıverilmesi üzerine hidrolitik enzimlerin etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada salıverilme ortamına lizozomal fraksiyon veya proteaz ilave edilmiş, heriki durumda da mikrokürelerden salıverilen etken madde miktarı artmıştır. Bu sonuç, tümör hücreleri içerisine endositoz yoluyla alınan mikrokürelerin lizozomal enzim tarafından sindirilebileceğini göstermiştir<sup>94</sup>.

Mikroküreler, daha uzun süre stabilize edildiklerinde etken maddenin salıverilmesinin yavaşlayacağına ait kanıtlar bulunmaktadır<sup>23</sup>.

Baker ve ark.<sup>64</sup>, polimer matriksin çapraz bağlanma derecesinin etken maddenin difüzyonla salıverilmesinde hız kısıtlayıcı bir basamak olduğunu ve artan oranlarda çapraz bağlayıcı madde kullandıklarında salıverilmenin yavaşladığını göstermişlerdir.

Oysa Tomlinson ve ark.<sup>60</sup> nın yaptığı bir çalışmanın sonuçlarına göre stabilizasyon süresinin uzatılması, mikrokürelerin içindeki etken maddenin difüzyonunu önemli ölçüde etkilememektedir. Aynı araştırmacılar mikroküreler içine % 45 (a/a) gibi yüksek düzeylerde etken madde yerleştirerek daha yüksek miktarlarda etken maddenin çok daha hızlı bir şekilde salıverildiğini ve bu sırada hala iki fazlı salıverilmenin korunduğunu saptamışlardır.

Mikrokürelerden in vivo ve in vitro salıverilme arasındaki ilişkiyi ve etken maddenin etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışma sayısı azdır<sup>62,94</sup>. Sugibayashi ve ark.<sup>62</sup> ascites-sarkoma taşıyan farelerin peritonu içinde in vivo etken madde (5-florourasil) salıverilmesini in vitro şartlarda izleyebilmek amacıyla dinamik diyaliz tekniği kullanmışlardır. Wakiyama ve ark.<sup>36</sup> ise, dibukain içeren polilaktik asid mikrokürelerinden etken maddenin in vitro ve in vivo salıverilme süreleri arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir.

Gama ışını ve otoklav sterilizasyonları, protein denatürasyon derecelerinde dolayısıyla da etken maddenin salıverilmesinde değişikliklere neden olabileceğinden, steril mikroküreler elde etmek için aseptik tekniklerin kullanılmasının daha uygun olacağı bildirilmiştir<sup>60</sup>.

#### I.1.8. Toksisite Çalışmaları

Albumin mikroküreleri günümüze kadar teşhis amacıyla intravenöz yolla kullanılagelen ve toksik etkilerinin çok düşük olduğu bildirilen sistemlerdir<sup>17,57</sup>.

Denatüre albumin antijen özellik göstermemekte<sup>17,123</sup> ise de literatürde pulmoner perfüzyon taraması yapmak amacıyla sadece bir hastaya i.v. yolla verilen <sup>99m</sup>Tc ile işaretlenmiş insan serum albumini mikrokürelere karşı şüpheli bir anaflaktik reaksiyon oluştuğunu bildiren bir yayın bulunmaktadır<sup>124</sup>.

Mikroküre toksisitesinde partikül büyüklüğü ve miktarı önemlidir. Davis ve ark.<sup>125</sup> intravenöz yolla verilen mikrokürelerin sıçanlardaki akut toksisite aralığını saptamışlar, buna göre partikül çapı 13.5  $\mu$ m den 90.7  $\mu$ m ye doğru artırıldığında bu aralığın gram vücut ağırlığı başına sırasıyla 154 000 den 705 partiküle kadar değiştiğini göstermişlerdir. Uygun dozlarda ve büyüklüklerde kullanılan taşıyıcıların toksik özellik göstermedikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir<sup>8,9,37,61,126</sup>.

DeLuca ve ark.<sup>11</sup>, intravenöz yolla verilen polistiren-divinilbenzen mikroküreleri ile köpeklerde hipotansiyon ve şoka neden olabilecek akut hemodinamik bozukluk oluştuğunu ancak bu sorunun büyük dozlar yerine daha küçük dozlarda mikroküre verilmesiyle giderilebileceğini bildirmişlerdir.

### I.1.9. Uygulama Alanları

Bugüne kadar farklı kolloidal partiküller değişik amaçlarla paranteral olarak kullanılmıştır. Intravenöz yolla verilen özel radyofarmasötikler insanlarda rutin teşhis işlemlerinde, radyoaktif madde ile işaretlenmiş insan serum albumini makroagregatları ve mikroküreleri pulmoner perfüzyon maddesi olarak kullanılmıştır<sup>100,125,127,128</sup>.

Radyoaktif madde ile işaretlenmiş polimerik maddelerden hazırlanan mikroküreler, dolaşım sistemi fonksiyonlarının incelenmesi<sup>17,19,129</sup> ile farklı yapıdaki çeşitli etken maddelerin intravenöz, intraarteriyel, intraperitoneal, subkütan, intraartiküler, intramusküler ve oral yolla verilebilmesi için olası ilaç dağıtım sistemleri olarak düşünülmüş ve üzerinde araştırmalar halen daha yoğun bir biçimde sürdürülmektedir<sup>17,18,19,21,68,91,123,128,130,131,132,133,134,135</sup>.

Mikrokürelerin sakkaroz intoleransının tedavisi<sup>75</sup>, tetrasiklin hidroklorür, teofilin<sup>76</sup>, sulfametizolün<sup>38</sup> kontrollü dağıtımı ve antihelmintik maddelerin verilmesi amacıyla oral yolla uygulanması tasarımlanmıştır.

Mikrokürelerin yüzey alanlarının büyük olmasından yararlanılarak ağır metal zehirlenmelerinin tedavisinde oral veya perfüzyon yoluyla kullanılmak üzere şelat yapıcı mikroküreler hazırlanmıştır<sup>81</sup>.

Hücre separasyonu sağlamak amacıyla mikrokürelerden yararlanılmıştır<sup>24,79,80</sup>.

Farklı büyüklüklerdeki plastik mikroküreler ise sıçanların çeşitli organlarındaki damar çaplarının ölçülmesinde kullanılmıştır<sup>136</sup>.

Ayrıca, i.m. veya s.c.yolla depo etki sağlamak<sup>57</sup>, i.p. ve i.v. yolla akut lösemi tedavisi<sup>41</sup>, s.c. yolla lokal anesteziklerin<sup>36,77</sup> ve subdermal yolla ise antimalarial maddelerin<sup>78</sup> uygulanması amacıyla çeşitli mikroküreler hazırlanmıştır.

Mikrokürelerden emboli oluşturularak anjiografide de yararlanılmıştır<sup>137,138</sup>.

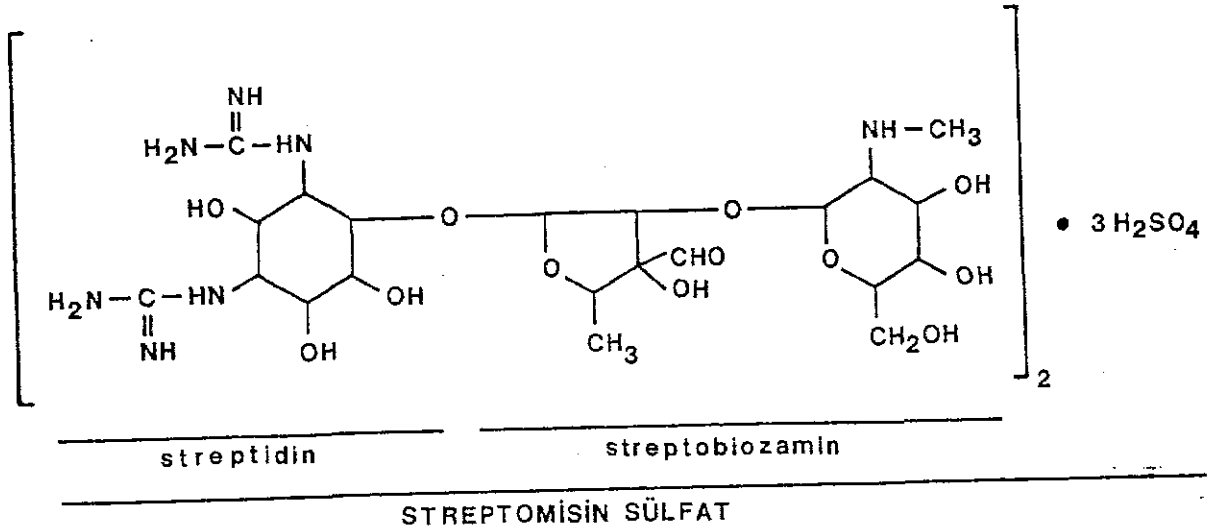
## I.2. STREPTOMİSİN SÜLFAT<sup>X</sup>

### I.2.1. Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Streptomisin sülfat, 1944 yılında Waksman ve ark.<sup>139,140</sup> tarafından Streptomyces griseus'dan izole edilmiş aminoglikozid grubu bir antibiyotik olan streptomisinin sülfat tuzudur.

<sup>X</sup> Molekül ağırlığı 1457.40 olan beyaz veya hemen hemen Streptomisin Sülfat'ın temin edildiği Liba Laboratuvarları A.Ş.'ne yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

beyaz, kokusuz veya az kokulu, hafif acı tadda katı bir madde olan streptomisin sülfatın kapalı formülü  $(C_{21}H_{39}N_7O_{12})_2 \cdot 3H_2SO_4$  olup, açık formülü aşağıdaki gibidir<sup>139</sup>.



Suda çok çözünür; etanolde çok güç çözünür, kloroform, eter ve diğer nonpolar çözücülerde pratik olarak çözünmez<sup>141</sup>,<sup>142,143</sup>. Erime derecesi saptanamamıştır<sup>144</sup>.

Streptomisin molekülü, esas olarak streptidin (1,3-diguanido 2,4,5,6-tetrahidroksi sikloheksan) ve streptobiozamin (streptoz ve N-metil-L-glukozamin) olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur<sup>145</sup>. Asit hidrolizi ile streptidin ve streptobiozamine parçalanır<sup>146,147,148,149,150</sup>. Alkalilerle ısıtıldığında ise maltola kadar parçalanır<sup>147,148</sup>.

### I.2.2. Miktar Tayini Yöntemleri

Streptomisin sülfat için literatürde çoğu kolorimetrik olan miktar tayin yöntemleri kayıtlıdır. Maddenin kolorimetrik miktar tayini, demir (III) klorür<sup>151</sup>, sodyum

nitroprussiyat-potasyum heksasiyanoferrat<sup>152,153</sup>, demir(III) amonyum sülfat ve fenol reaktifi<sup>153</sup>, periyodat-tiyobarbitürik asid<sup>154,155</sup>,  $\alpha$ -naftol-diasetil<sup>156,157</sup>, Raynekat tuzları<sup>158</sup> gibi belirteçler kullanılarak yapılmıştır.

Asid veya alkali hidroliz uygulanarak maddenin spektrofotometrik tayini de yapılmıştır<sup>151,159</sup>.

Farmakopelerde ise maddenin mikrobiyolojik tayin yöntemleri kayıtlıdır<sup>141,160</sup>.

Araştırmamızda asid hidroliz uygulandıktan sonra spektrofotometrik olarak miktar tayini yapılmıştır<sup>159</sup>.

### I.2.3. Stabilite Çalışmaları

Streptomisin, baz veya tuzları halinde kuru olmak şartıyla oda sıcaklığında en az iki yıl aktivitesini korur<sup>145,161</sup> ve sıcaklık arttıkça aktivite kaybı hızlanır. Madde katı halde iken 50°C de 10 haftada % 2,5-5 veya daha fazla aktivite kaybı görülmüştür<sup>145</sup>.

Dilüe çözeltileri (25 000-50 000 i.Ü./ml) 38°C'de dahi uzun süre dayanıklıdır. Konsantre çözeltileri (250 000-500 000 i.Ü./ml) ise buzdolabında ve oda sıcaklığında oldukça uzun süre aktivitesini korur ancak 38°C de daha az dayanıklıdır<sup>161</sup>.

Streptomisin çözeltileri ışıқта bekletildiğinde renklenme gösterirler, ancak yüksek derecede saf çözeltileri dahi ışıқта renk değişikliğine uğrarlar<sup>13</sup>. Renk değişmesinin



aktivite kaybı ile ilişkisi olmamasına karşın karanlıkta saklanması farmasötik açıdan uygun olacağı belirtilmiştir<sup>145,161</sup>.

Streptomisin çözeltileri, pH 3-7 aralığında oda sıcaklığında ve yüksek yaz sıcaklıklarında belirgin bir aktivite kaybı olmaksızın uzun süre dayanıklı bulunmuştur<sup>142,162</sup>. Deneysel kanıtlar, 7 ve hatta biraz üzerindeki pH'larda daha dayanıklı olduğunu göstermiştir<sup>148,161</sup>. pH'sı 6-8 arasına ayarlanan çözeltilerinde oda sıcaklığında bir ay boyunca hiç aktivite kaybı gözlenmemiştir<sup>145</sup>. pH 6.6'da ve 50°C'de ise antibakteriyel aktivitesinin yaklaşık 1/3'ünü iki haftada kaybedebileceği gösterilmiştir<sup>145</sup>.

Kuvvetli asidler ve alkaliler tarafından çok hızlı bir şekilde dekompoze edilirler<sup>148</sup>.

Çözeltilerinin formaldehid, klorkrezol, fenol ve fenilmerkürü nitrat ile geçimli olduğu bildirilmiştir<sup>13</sup>.

#### I.2.4. Farmakolojik Özellikleri

Streptomisin, hernekadar staphylococcus, aerobic streptococcus ve pneumococcus gibi gram-pozitif mikroorganizmalara karşı etkili ise de önemli bir karakteristiği, birçok gram-negatif bakteriye ve özellikle Mycobacteria grubuna karşı aktif olmasıdır<sup>14</sup>. Streptomisin, tüberküloz mikroorganizmalarına karşı antitüberküloz etkiye sahip ilk ilaçtır<sup>161</sup>. Bu amaçla diğer çeşitli antibiyotikler ve kemoterapötik maddeler kullanılmasına rağmen streptomisin

uzun yıllardan beri bu enfeksiyon türüne karşı tercih edilen bir ilaçtır<sup>15</sup>.

Streptomisin'in, protein sentezini inhibe ederek ve hücre zarının geçirgenliğini bozarak etkisini gösterdiği bildirilmiştir<sup>15,163,164</sup>.

Streptomisin, düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik yüksek konsantrasyonlarda ise bakterisid etki göstermektedir<sup>165</sup>. Antibakteriyel aktivitesi, hafif alkali (pH 7.8) ortamda en yüksek, pH'sı 6.0 veya daha düşük olan ortamda ise önemli derecede düşüktür<sup>15</sup>. Nitekim, streptomisin sülfatın pH 7.1'de pneumococci'nin bir suşunu 20 µg/ml ile inhibe ettiği halde, pH 6.8' de aynı inhibisyonu 50 µg/ml ile sağlayabildiği bildirilmiştir<sup>14</sup>.

Streptomisin sülfat ile sistemik tedavi genellikle i.m. yoldan yapılmakta fakat bu sırada enjeksiyon yerinde baz maddeye oranla az da olsa ağrı ve irritasyon oluşmakta ağrıyı gidermek için birlikte prokain verilmektedir<sup>166</sup>. Barsak kanalından hiç absorbe olmayan streptomisin sülfat günlük 0,5-1.0 g. baz streptomisine ekivalan dozda i.m. yolla verilir<sup>167</sup>. Minimum etkin konsantrasyonu yaklaşık 7 µg/ml'dir<sup>13</sup>. Piyasada tek başına veya kombine halde flakonları mevcuttur.

Streptomisin'in vücuttaki dağılımı daha çok ekstraseküllerdir. Bu madde serebrospinal sıvıya pek geçmez ve çoğu böbrekle atılır. Glomerülden süzülür ve reabsorbe olmaz<sup>15</sup>.

Toksisite ve yan etkileri, enjeksiyon yerinde ağrı ve irritasyon, sekizinci sinir üzerine etki, sağırılık, hipersensitivite ve nöromüsküler blokaj şeklinde özetlenebilir<sup>15, 164,167</sup>.

## II. DENEYSEL

### II.1. Araç ve Gereçler

#### II.1.1. Kullanılan Maddeler

2,3-Butandion

Formaldehid

Merck

İnsan serum albumini

Behringwerke AG.

Jelatin

Merck

Mısır yağı

Kademoğlu

Pamuk yağı

Antbirlik

Streptomisin sülfat

Pfizer

#### II.1.2. Kullanılan Aletler

Spektrofotometre (U.V.)

Hitachi 220

Spektrofotometre (I.R.)

Perkin-Elmer, Model 457

Gama sayıcısı

Berthold, Model 5300

$^{99m}\text{Tc}$  jeneratörü

Amersham

Taramalı elektron mikroskop

Hitachi S-700

Optik mikroskop

Karl Kaps

Mekanik karıştırıcı

Heidolf RZR-1

Ultrasonik banyo

Bransonic 220

Viskometre

Brookfield, Model LVTD

Erime derecesi tayin aygıtı

Thomas Hoover

Termostatlı laboratuvar çalkalayıcısı

Gerhardt, Tip L 88-1

pH metre

Emaf-EM 78x

Santrifüj aleti

Wirowka WE-2

El homojenizatörü

Yerli

## II.2. YÖNTEMLER ve DENEYLER

Bu bölümde araştırmamızda uygulanan yöntemler ve deneyler anlatılacaktır. Araştırmamızdaki deneyler, kimyasal ve fizikokimyasal incelemeler, mikrokürelerin hazırlanması ve özelliklerinin tayini, etken maddenin mikrokürelere in vitro salıverilmesinin incelenmesi mikrokürelerin organizmadaki dağılımlarının in vivo incelenmesi olmak üzere dört grupta toplanmaktadır:

### II.2.1. Kimyasal ve Fizikokimyasal İncelemeler

Bu kısımda, kullanılan maddelerin bilinen özellikleri kontrol edilecek, bilinmeyenler ise araştırılacaktır.

### II.2.2. Mikrokürelerin Hazırlanması ve Özelliklerinin Tayini

Matriks maddesi olarak insan serum albumini ve jelatin kullanarak emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile streptomisin sülfat mikroküreleri hazırlanacak ve özellikleri araştırılacaktır.

### II.2.3. Etken Maddenin Mikrokürelere In Vitro Salıverilmesinin İncelenmesi

Albumin ve jelatin mikrokürelerinden streptomisin sülfatın salıverilmesi incelenecektir.

### II.2.4. Mikrokürelerin Organizmadaki Dağılımlarının In Vivo İncelenmesi

Bu bölümde, radyoaktif olarak işaretlenen albumin ve

jelatin mikrokürelerinin deney hayvanı olarak kullanılan farelerin organlarındaki dağılımları izlenecektir.

## II.2.1. Kimyasal ve Fizikokimyasal İncelemeler

### II.2.1.1. Streptomisin Sülfatın Standardizasyonu

#### II.2.1.1.1. U.V. Spektrumu

Streptomisin sülfatın 0.2 N  $H_2SO_4$  deki %1<sup>a</sup>/h çözeltisinin U.V. spektrumu 350-200 nm aralığında çekilmiştir.

#### II.2.1.1.2. I.R. Spektrumu

Streptomisin sülfatın I.R. spektrumu 4000-250  $cm^{-1}$  aralığında ve potasyum bromür diskler arasında çekilmiştir.

#### II.2.1.1.3. Erime Noktası Tayini

Kılcal bir tüp içine yerleştirilmiş olan bir miktar streptomisin sülfatın erime noktası, erime derecesi tayin aygıtında saptanmıştır.

#### II.2.1.1.4. Partikül Büyüklüğünün Saptanması

Streptomisin sülfatın partikül büyüklüğü dağılımı e-  
lek analizi yöntemi ile tayin edilmiştir. 50 g streptomisin  
sülfat kullanılarak ortalama partikül büyüklüğü saptanmıştır.

#### II.2.1.1.5. Aktivite Tayini

Kullanılan streptomisin sülfatın aktivite tayini Refik Saydam Merkez Hıfzıssıhha Enstitüsü İlaç Kontrol Şubesinde agar difüzyon yöntemine göre saptanmıştır

### II.2.1.1.6. Streptomisin Sülfatın İnce Tabaka Kromatografisi ile Tanınması

Streptomisin sülfatın ince tabaka kromatografisi ile tanınmasında iki farklı çözücü sistemi kullanılmıştır. Streptomisin sülfatın sudaki ve pH 7.4 izotonik fosfat tamponundaki %0.1 a/h çözeltileri, 0.25mm kalınlığında Silica gel G kaplanmış plaklara 10µl olarak uygulanmıştır. Plaklar kurutulduktan sonra Kloroform -Metanol-%25 Amonyak (50:25:25)<sup>169</sup> çözücü sisteminde 11cm sürüklendikten sonra kurutulmuştur. İkinci çözücü sistemi olan Metanol -%25 Amonyak (1.5:100)<sup>143</sup> karışımında 11 cm sürüklendikten sonra kurutulmuştur. Plaklara belirteç olarak 1'g potasyum permanganatın suda çözülerek 100 ml ye tamamlanmasıyla hazırlanan potasyum permanganat çözeltisi<sup>143</sup> püskürtülerek lekeler incelenmiştir. Deneyler oda sıcaklığında yapılmıştır.

### II.2.1.2. Streptomisin Sülfatın Stabilitesi

Streptomisin sülfat mikrokürelerinin hazırlanması ve in vitro salıverilme deneyleri sırasında stabilitesini koruyup korunmadığının anlaşılması için aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

#### II.2.1.2.1. Parçalanma Ürünlerinin Kağıt Kromatografisi ile Ayrılması

Streptomisin sülfatın parçalanma ürünlerini ayırabilmek amacıyla kağıt kromatografisi uygulanmıştır.<sup>(170)</sup> Streptomisin sülfatın ve parçalanma ürünlerinin Rf değerlerinin saptanması için yapılan çalışmada, 0,2 g Streptomisin sülfat; 0,1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 2 ml metil alkol karışımında 2 dakika kaynar su

banyosunda ısıtılarak streptidin ve strobotiozamine parçalanması sağlanmıştır. <sup>141</sup> Bu çözeltiden S & S (Nr.2040ax2074) kromatografi kağıdına 10 µl uygulanmıştır. Ayrıca oluşacak lekelerin parçalanma ürünlerine ait olup olmadığını anlayabilmek için streptomisin sülfatın sudaki % 0.1 a/h çözeltisi ile 0.1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 2ml metanol karışımından 10µl uygulanmıştır. Kağıt kurutulduktan sonra n-butanol-piridin-su (16:32:12) çözücü sistemi içinde 11 cm sürüklenmiş ve kurutulmuştur. Belirteç olarak kullanılan alkali gümüş nitrat çözeltisi <sup>171</sup> aşağıdaki şekilde hazırlanıp, uygulanmıştır;

Çözelti I : 1 ml doymuş gümüş nitrat sulu çözeltisi aseton ile 200 ml ye tamamlanmış ve oluşan çözeltiyi çözmek için 5-10 ml su ilave edilmiştir.

Çözelti II: Sulu metanoldeki 0.5 N sodyum hidroksid çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 20g sodyum hidroksid az miktar suda çözülmüş ve metanol ile 1000 ml ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan bu iki çözeltinin peşpeşe püskürtüldüğü kağıt 100°C lik etüvde 1-2 dakika tutulduktan sonra lekeler incelenmiştir. Lekeler aynı zamanda U.V. lambası altında 366nm de kontrol edilmiştir. Deneyler oda sıcaklığında yapılmıştır.

II.2.1.2.2. In Vitro Salıverilmesi Sırasında Stabilitesinin İncelenmesi



Salıverilme ortamı olan 25ml pH 7.4 izotonik fosfat tamponuna 100 mg mikroküre ilave edilmiş ve 50 cpm hızla yatay olarak çalkalanarak 37°C de 3 saat tutulmuştur. Bu işlem streptomisin sülfat içeren ve içermeyen mikrokürelere aynı anda uygulanmıştır. Bu süre sonunda çözeltiler süzgeç kağıdından süzülerek Bölüm II.2.1.2.1.'de anlatıldığı biçimde kağıda uygulanmıştır. Bu sırada streptomisin sülfatın pH 7.4 izotonik fosfat tamponunda yeni hazırlanmış, oda sıcaklığında ışıktan korunarak 1 ay bekletilmiş ve 37°C de 3 saat tutulmuş % 0.2 a/h çözeltilerinden de uygulanmıştır. Alkali gümüş nitrat belirteci püskürtüldükten sonra lekeler incelenmiştir. Deneyleroda sıcaklığında yapılmıştır.

### II.2.1.3. Streptomisin Sülfatın Miktar Tayini

Wahbi ve ark <sup>159</sup> 'nın streptomisin sülfat için verdiği spektrofotometrik miktar tayini yöntemi sulu ortam yerine pH 7.4 izotonik fosfat tamponu kullanılarak modifiye edilmiştir.

3 mg streptomisin sülfat 25 ml lik balon jöjeye konulmuş üzerine 5 ml pH 7.4 izotonik fosfat tamponu ve 5 ml 0.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilmiştir. Balon jöjeye, alüminyum folia ile kaplanmış kauçuk bir tıpa yardımıyla, buharın yoğunlaşmasını sağlamak için 30 cm uzunluğunda, iç çapı 0.4, dış çapı 0.6 cm olan cam bir boru yerleştirilerek kaynar su banyosunda 2 saat süreyle ısıtılmıştır. Daha sonra çözelti soğütularak pH 7.4 izotonik fosfat tamponu ile 25 ml ye tamamlanmıştır. Konsantrasyonu  $4.11 \times 10^{-5}$  M olan bu çözelti U.V. spektrofotometresinde taranmıştır.

Mikrokürelerdeki streptomisin sülfatın miktar tayini çalışmalarının yapılacağı dalga boyunun saptanması amacıyla streptomisin sülfat içeren mikrokürelerin 10 mg'ına aynı işlemler uygulandıktan sonra U.V. spektrumları alınmıştır.

Matriks maddelerinin çalışılacak olan dalga boyunda streptomisin sülfatın maksimum asorpsiyonunu etkileyip, etkilemediğini saptamak amacıyla streptomisin sülfat içermeyen boş mikrokürelerin 10 mg'ına streptomisin sülfat miktar tayininde anlatılan işlemler uygulanmıştır.

#### II.2.1.3.1. Standart Eğri

Streptomisin sülfatın pH 7.4 izotonik fosfat tamponu içinde  $25 \times 10^{-5}$  M konsantrasyondaki stok çözeltisinden,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $6 \times 10^{-5}$ ,  $7 \times 10^{-5}$ ,  $8 \times 10^{-5}$  M konsantrasyonlarda çözelti hazırlamak için gerekli miktarlar çekilip, üzerlerine 5 ml 0.5 N  $H_2SO_4$  ilave edilmiş, kaynar su banyosunda 2 saat ısıtıldıktan sonra soğutulmuş ve pH 7.4 izotonik fosfat tamponu ile 25 ml'ye tamamlanmıştır. 320 nm de köre karşı absorbanlar okunarak, ortalama absorptivite (a) değeri 11145 bulunmuştur. Bulunan değerlerin Lambert-Beer kanununa uygunluğu gösterilmiştir. Doğrunun denklemi bulunmuş, doğrusallıktan ayrılışın ve korelasyon katsayısının önem kontrolü testleri yapılmıştır. <sup>172</sup>

#### II.2.1.4. Matriks Maddelerinin Standardizasyonu

Matriks maddesi olarak kullanılan jelatin ve insan serum albumininin izoelektrik noktaları tayin edilmiştir.

#### II.2.1.4.1. Jelatinin İzoelektrik Noktasının Tayini

Kullanılan jelatinin izoelektrik noktasını tayin etmek için İzgü ve Doğanay<sup>173</sup>'in kullandıkları yöntem uygulanmıştır. 500ml %0.5 a/h jelatin çözeltisi hazırlanıp, pH'sının 5.8 olduğu saptanmıştır. Jelatin çözeltisinin pH'sı 1 N ve 0,1 N HCl ile 5.4'e ayarlanıp, 10 ml çekilerek bir deney tüpüne alınmış; kalan çözeltinin pH'sı 5.3'e ayarlanıp, tekrar 10 ml çekilerek bir başka tüpe alınmıştır. Bu şekilde 0.1 pH aralıklarla 5.4 ile 4.7 arasındaki pH'larda bir seri jelatin çözeltisi hazırlanmıştır. Her tüpe 1 ml isopropanol ilave edilip, tüplerin ağızları kapatılarak buzdolabında -2°C de 12 saat bekletilmiştir. Daha sonra tüpler dışarı alınarak bulanıklık derecesi incelenerek kullanılan jelatinin izoelektrik noktası ve tipi saptanmıştır.

#### II.2.1.4.2. Albuminin İzoelektrik Noktasının Tayini

Kullanılan albuminin izoelektrik noktası, jelatin için kullanılan yöntemle saptanmıştır<sup>173</sup>. Bunun için 250ml %0.1 a/h albumin çözeltisi hazırlanıp, pH'sının 7.2 olduğu saptanmıştır. Albumin çözeltisinin pH'sı 1 N ve 0.1 N HCl kullanılarak 5.4'e ayarlanıp, 10 ml çekilerek bir deney tüpüne alınmıştır. Kalan çözeltinin pH'sı 5.3'e ayarlanıp, tekrar 10 ml çekilerek bir başka tüpe alınmıştır. Bu şekilde 0,1 pH aralıklarla 5.4 ile 4.7 arasındaki pH'larda bir seri albumin çözeltisi hazırlanmıştır. Her tüpe 5 ml isopropanol ilave edilip, tüplerin ağızları kapatılarak buzdolabında -2°C de 12 saat bekletilmiştir. Daha sonra tüpler dışarı alınarak bulanıklık dereceleri incelenerek kullanılan albuminin izoelektrik noktası

saptanmıştır.

#### II.2.1.5. Kullanılan Bitkisel Yağların Standardizasyonu

Mikrokürelerin hazırlanmaları sırasında kullanılan pamuk ve mısır yağının viskoziteleri tayin edilmiştir.

##### II.2.1.5.1. Pamuk ve Mısır Yağının Viskozitesinin Tayini

Bu amaçla heriki yağdan da 250 ml alınıp, Brookfield dijital viskometre (Model LVTD) de 25 ve 40°C de ölçüm yapılmıştır. Ölçümler, 2 nolu spindle kullanılarak 30 r.p.m. hızda yapılmıştır. Viskometrede okunan değerler faktör ile çarpılarak sonuçlar mPa.s olarak bulunmuştur.

#### II.2.2. Mikrokürelerin Hazırlanması ve Özelliklerinin Tayini

##### II.2.2.1. Mikrokürelerin Hazırlanması

Streptomisin sülfatın mikroküreleri, matriks maddesi olarak insan serum albumini ve jelatin (B tipi) kullanılarak emülsiyon polimerizasyonu yöntemine göre hazırlanmıştır. Su da çözünen etken maddelere uygulanan bu yöntemde, streptomisin sülfat ve matriks maddesinin (albumin veya jelatin) sudaki çözeltisi bitkisel yağ ile karşılaştırılarak su/yağ emülsiyonu oluşturulmuş daha sonra organik çözücü ilavesiyle matriks polimerize edilmiştir.

Literatürde mikrokürelerin etken madde içerikleri genellikle %30 olarak belirtildiğinden çalışmamızda herhangi bir doz düşünülmeksizin bu oran gözönüne alınarak hazırlama sırasında matriks çözeltisine gerekli miktarda streptomisin sülfat ilave edilmiştir.

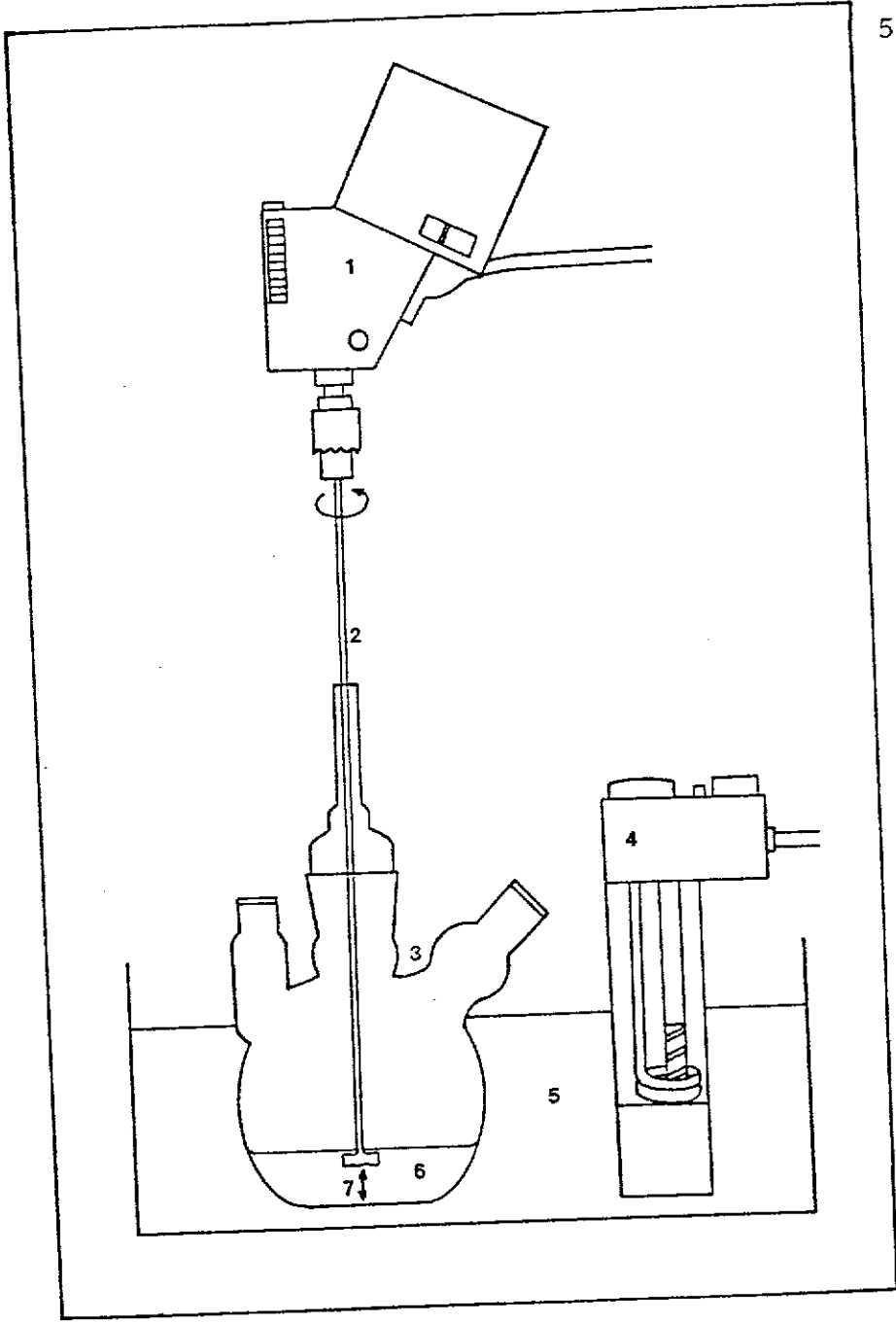
### II.2.2.1.1. Albumin mikrokürelerinin Hazırlanması

Scheffel ve ark<sup>17</sup> tarafından geliştirilen ve Widder ve ark<sup>23</sup> tarafından modifiye edilen emülsiyon Polimerizasyonu yöntemi uygulanarak albumin mikroküreleri hazırlanmıştır.

125 mg albumin ve 150 mg streptomisin sülfat üzerine 0.5 ml su ilave edilerek hazırlanan çözelti (in vivo deneylerde kullanılan mikrokürelere bu aşamada, <sup>99m</sup>Tc ile işaretlemenin yeterli ve kolay yapılabilmesi amacıyla %10 Fe(OH)<sub>3</sub> eklenmiştir) 30 ml pamuk yağı ile karıştırıldıktan sonra el homojenizatöründen<sup>(x)</sup> bir kez geçirilmiştir.

Hazırlanan bu su/yağ emülsiyonu, içine cam karıştırıcı yerleştirilmiş üç boyunlu balon içinde 1000 rpm ve 25°C de karıştırılmakta olan 100 ml pamuk yağına 10 ml/dak hızla ilave edilmiştir (Şekil 6). 5 dakika karıştırıldıktan sonra 100 ml eter ilave edilip, 2000xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çöken mikroküreler 0,2 M 2,3- butandion içeren 100 ml eterde süspansiyon edilmiş ve çapraz bağ oluşturarak mikroküreleri stabilize etmek amacıyla 1000 rpm de ve 25°C de 15 dakika karıştırılmıştır. Mikroküre süspansiyonu, 2,3- butandionun aşırısını ortamdaki uzaklaştırmak için 2000xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Mikroküreler 100 ml eter ile aynı şekilde ardarda 4 kez santrifüj edilmiş, eterle süzülerek toplanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bu şekilde 8 seri albumin mikroküresi hazırlanıp, birleştirilerek deneylerde kullanmak üzere desikatörde adsorban üzerinde karanlıkta ve 4°C'de nemden korunarak saklanmıştır.

(x) Uygun büyüklükte mikroküre elde edilmesi amacıyla yapılan ön denemelerde homojenizatörün en uygun olarak tesbit edilen delik genişliği bütün hazırlama işlemlerinde sabit tutulmuştur.



Şekil 6 : Mikrokürelerin Hazırlanmasında Kullanılan Sistem

- 1) Mekanik karıştırıcı
- 2) Cam karıştırıcı
- 3) Üç boyunlu balon
- 4) Termostatlı ısıtıcı
- 5) Su banyosu
- 6) Mikrokürelerin oluşturulduğu ortam
- 7) Balonun dip kısmı ile karıştırıcı arasındaki uzaklık  
(1cm).

## II.2.2.1.2. Jelatin Mikrokürelerinin Hazırlanması

Tanaka ve ark<sup>174</sup> tarafından geliştirilen ve Yoshioka ve ark<sup>30</sup> tarafından modifiye edilen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi esas alınarak jelatin mikroküreleri hazırlanmıştır.

%30 a/h streptomisin sülfat içeren 10 ml % 20 a/h Jelatin çözeltisi (in vivo deneylerde kullanılan mikrokürelere bu aşamada, işaretleme amacıyla <sup>99m</sup>Tc ile işaretlenmiş 1 ml albumin çözeltisi eklenmiştir) cam karıştırıcılı üç boyunlu balon içinde 1000 rpm hızla 40°C de karıştırılmakta olan ve %0,1 h/h Tween-80 içeren 100 ml mısır yağına 5ml/dak hızla ilave edilmiştir (Şekil 6 ). Bu şekilde 10 dakika karıştırıldıktan sonra elde edilen su/yağ emülsiyonu, kürelerin jelyasyonunu sağlamak için buz banyosunda 10 dakika soğutulmuş ve 100 ml soğuk aseton ilave edilerek 2000xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Çöken mikroküreler %10h/h formaldehid içeren 100 ml aseton da süspande edilmiş ve çapraz bağ oluşturarak mikroküreleri stabilize etmek için 1000 rpm de ve 25°C de 10 dakika karıştırılmıştır. Mikroküre süspansiyonu, formaldehidin aşırısını ortamdan uzaklaştırmak için 2000xg de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Mikroküreler 100 ml aseton ile aynı şekilde ardarda 4 kez santrifüj edilmiş, asetonla süzülerek, toplanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bu şekilde 4 seri jelatin mikroküresi hazırlanıp, elenmiş ve 45µm lik elekten geçenler birleştirilerek deneylerde kullanmak üzere desikatörde adsorban üzerinde karanlıkta ve 4°C 'de nemden korunarak saklanmıştır.

## II.2.2.2. Mikrokürelerin Özelliklerinin Tayini

Bu bölümde, mikrokürelerin şekilleri, partikül büyüklüğü dağılımı, mikrokürelerdeki etken madde miktarı ve mikrokürelerin verimi incelenecektir.

### II.2.2.2.1. Şekil ve Büyüklükleri

Bu amaçla, albumin ve jelatin mikroküreleri altınla tozlanıp, iki tarafı yapışkan bir band üzerine sürüldükten sonra taramalı elektron mikroskobu ile fotoğrafları çekilmiştir<sup>(x)</sup>.

### II.2.2.2.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımları

Mikrokürelerin partikül büyüklüğü dağılımını saptamak amacıyla optik mikroskop yöntemi kullanılmıştır<sup>175</sup>. Mikroküreler Tween-80 içinde ultrasonik banyoda tutularak tekdüze dağıtılmıştır. 1000 partikül sayılmış, kümülatif ağırlık yüzdeleri olasılık, partikül büyüklükleri de logaritmik eksene çizilerek ortalama partikül büyüklükleri saptanmıştır.

### II.2.2.2.3. Mikrokürelerdeki Streptomisin Sülfat Miktarı ve Mikroküre Hazırlama Verimi

Mikrokürelerin etken madde içeriğinin saptanması için etken maddenin matriks maddesinden tamamen kurtarılması gerektiğinden, miktar tayini yöntemi olarak Wahbi ve ark.<sup>159</sup> tarafından geliştirilen spektrofotometrik tayin yöntemi kullanıldı.

(x) Fotoğraflar, Mr. P.Wägli (Institut für Festkörperphysik, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland) tarafından çekilmiştir.



mıştır. Bu yöntemde streptomisin sülfatın tayin edilebilmesi için 0.5 N  $H_2SO_4$  ilave edilip 2 saat gibi uzun bir süre kaynar su banyosunda tutularak parçalanması gerekmektedir. Bu asid hidroliz sırasında matriks maddelerininde eriyeceği<sup>173</sup> ve etken maddenin tümünün serbest hale getirilebileceği varsayılmış ve ön denemelerle bu kanıtlanmıştır. Seçilen bu yönteme göre 4 mg mikroküredeki streptomisin sülfat miktarı Bölüm II.2.1.3 deki şekilde tayin edilmiştir.

Hazırlandıktan sonra kurutulan mikroküreler tartılıp, gram olarak ağırlıkları saptanmıştır. Mikrokürelerin hazırlanışı sırasında ilave edilen maddelerin gram olarak ağırlıkları bilindiğinden albumin ve jelatin mikrokürelerinin verimi hesaplanmıştır. Bulunan değerler, hazırlanan 8 seri albumin ve 4 seri jelatin mikrokürelerinin ortalamasıdır.

II.2.3. Streptomisin Sülfat'ın Mikrokürelerden İn Vitro Salıverilmesinin İncelenmesi

II.2.3.1. Salıverilme Ortamı

Salıverilme ortamı olarak streptomisin sülfat'ın stabilitesi açısından da uygun olan pH 7.4 izotonik fosfat tampunu kullanılmıştır<sup>141</sup>.

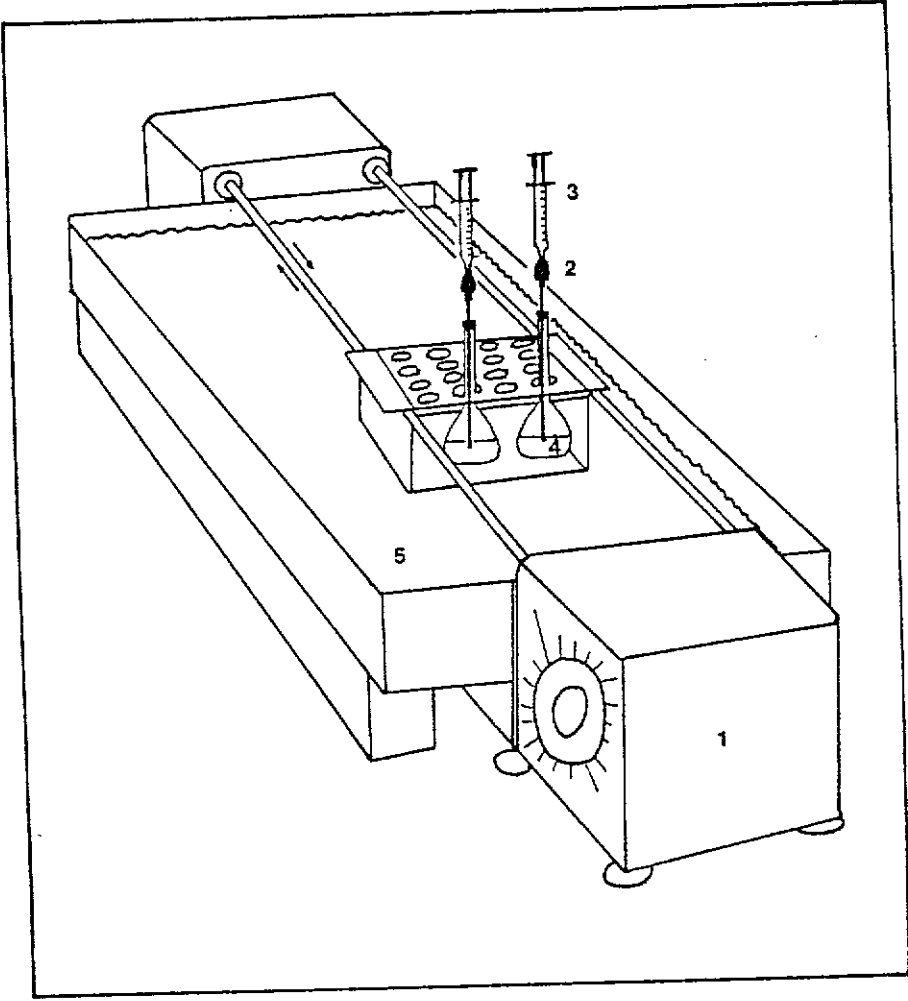
Salıverilme ortamı olarak pH 7.4 izotonik fosfat tampunu kullanıldığından, tampon hazırlanırken sodyum klorür ile izotonik yapılmıştır.

### II.2.3.2. Salıverilme Hücresi

Bu araştırmada  $37^{\circ}\text{C}$  de hafif çalkalama ile inkubasyon yöntemine <sup>23,30,36,77</sup> uygun olarak salıverilmenin incelenmesi için Şekil 7'de görülen sistem geliştirilmiştir. İçinde 2.5 ml pH 7.4 izotonik fosfat tamponu bulunan 50 ml lik balon joje salıverilme hücresi olarak kullanılmıştır. Balon joje yatay çalkalayıcıya yerleştirildikten sonra pH 7.4 izotonik fosfat tamponu termostatlı su banyosu yardımıyla  $37 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış ve 50 c.p.m. hızla çalkalanmıştır. Salıverilme hızı incelenecek olan işaretlenmemiş 100 mg mikroküre ilave edildikten hemen sonra, her seferinde aynı düzeyden örnek alınabilmesini sağlamak için dipten yüksekliği 1 cm olacak şekilde a- yarılanmış, dış çapı 0.4, iç çapı 0.2 cm olan cam bir boru, kauçuk tıpa yardımıyla balon jojenin içine daldırılarak tesbit edilmiştir. Bu cam boruya içinde Whatman 41 süzgeç kağıdı bulunan süzgeç tutucusu ile 2.5 ml lik enjektör takılarak, alınan 1 ml örneğin süzülmesi sağlanmıştır. Aynı şartlara ve özelliklere sahip bir başka balon jojeye ise, ölçümlerde kör olarak kullanılmak üzere etken madde içermeyen 100 mg mikroküre konmuştur.

### II.2.3.3. Deney Yapılışı

Etken madde içeren ve içermeyen mikrokürelerin bulunduğu heriki salıverilme ortamından belirli zaman aralıklarında Whatman 41 süzgeç kağıdından süzülerek 1'er ml örnek alınmıştır. Aynı düzeyden alınan her 1 ml örnek yerine yine aynı yolla  $37 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 'de 1 ml pH 7.4 izotonik fosfat tamponu ilave edilmiştir. Belirli zaman aralıklarda alınan örnekler 25 ml lik



Şekil 7 : Salıverilmenin İncelenmesi Amacıyla Kullanılan Sistem

- 1) Yatay çalkalayıcı
- 2) Filtre
- 3) Enjektör
- 4) Salıverilme ortamı
- 5) Su banyosu

balon jöjelere aktarılmış ve sonuncu örnekte alındıktan sonra herbirine Bölüm II.2.1.3.'deki işlemler uygulanmış ve mikrokürelerden salıverilen streptomisin sülfat miktarı hesaplanmıştır.

#### II.2.3.4. Verilerin Gösterilişi

Belirli zaman aralıklarında salıverilme ortamından alınan örneklerin spektrofotometrede 320 nm'de okunan absorpsiyonlarından standart eğri yardımıyla streptomisin sülfat miktarları hesaplanmıştır. Bulunan bu değerlerin ortalamaları alındıktan sonra zamana karşı, yüzde (%) salıverilen streptomisin sülfat miktarları grafiğe geçirilmiştir.

#### II.2.4. Mikrokürelerin Organizmadaki Dağılımlarının İn Vivo İncelenmesi

##### II.2.4.1. Deneyde Kullanılan Streptomisin Sülfat'ın ve Mikrokürelerin İşaretlenmesi

##### II.2.4.1.1. Serbest Streptomisin Sülfat'ın $^{99m}\text{Tc}$ ile İşaretlenmesi

Serbest streptomisin sülfatı işaretlemek için aşadaki işlem uygulanmıştır<sup>103</sup>.

50 mg streptomisin sülfat, 2 ml su içinde çözüldükten sonra 0.1 ml (10 mg/10 ml su)  $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ilave edilerek 5 dakika karıştırılmış ve pH 7'ye ayarlanmıştır. Çözelti 0.22  $\mu\text{m}$  lik millipore filtreden süzülerek içinde  $^{99m}\text{Tc O}_4$  içeren 1-2 ml serum fizyolojik bulunan bir flakona aktarılmıştır.

#### II.2.4.1.2. Albumin Mikrokürelerinin <sup>99m</sup>Tc ile İşaretlenmesi

Albumin mikrokürelerini işaretlemek için Rhodes ve ark<sup>19</sup> tarafından kullanılan yöntem uygulanmıştır. İşaretlemenin yeterli ve kolay yapılabilmesi amacıyla başlangıç çözeltisinin %10 a/h'u kadar Fe(OH)<sub>3</sub> içeren albumin mikroküreleri hazırlanmış ve aşağıdaki yöntemle göre işaretlenmiştir.<sup>19</sup>

İçinde 10 mg albumin mikroküreleri ve teflon kaplanmış bir magnetik karıştırıcı bulunan flakona 0.1 ml %5 h/h Tween-80 çözeltisi ile 5-10 mCi TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> içeren 5-7.5 ml serum fizyolojik ilave edildikten sonra mikroküreler süspande edilmiştir. Bu süspansiyon üzerine 0.35 ml sodyum tiyosülfat çözeltisi (8mg/ml) ve 0.4 ml 1 N HCl ilave edilmiş, kaynar su banyosunda magnetik karıştırıcı kullanılarak 10 dakika karıştırılmıştır. Mikroküreler soğutulup, çöktürüldükten sonra sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. 7 ml serum fizyolojik ilave edilip, çalkalandıktan sonra mikrokürelerin çökmesi sağlanmış ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Daha sonra % 0.1 h/h Tween-80 içeren 5 ml serum fizyolojik ilave edilerek enjeksiyona hazır hale getirilmiştir.

#### II.2.4.1.3. Jelatin Mikrokürelerinin <sup>99m</sup>Tc ile İşaretlenmesi

Albumin mikrokürelerine uygulanan yöntemle sonuç alınamadığından, jelatin mikroküreleri hazırlanırken matriks çözeltisine <sup>99m</sup>Tc ile işaretlenmiş 1 ml albumin çözeltisi<sup>30</sup> ilave edilerek mikrokürelerin işaretlenmesi sağlanmıştır. Albumini işaretlemek için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır.<sup>103,176</sup>

20 mg askorbik asid; 2 ml  $\text{TCO}_4^-$  ve 0.1 ml  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (50 mg/ml 1 M HCl) karışımında çözülmüştür. Çözeltinin pH sı 0.5 M NaOH ile 8.5-9.5'a ayarlandıktan sonra 50 mg albumin ilave edilerek çözülmesi sağlanmış ve 1 M HCl yardımıyla pH 1.0-2.0'ye düşürülmüştür. Oda sıcaklığında 10 dakika beklendikten sonra 0.5 M NaOH kullanılarak pH 6.0'ya ayarlanmıştır.

#### II.2.4.1.4. İşaretleme Kalite Kontrolü

İşaretleme kalite kontrolü, silica gel ile empregne edilmiş özel plakların (Gelman ITLC-SG) kullanıldığı ince tabaka kromatografisi yöntemi ile incelenmiştir.<sup>103</sup>

5µl örnek uygulanan plak, içinde aseton bulunan kromatografi tankına yerleştirildikten sonra çözücünün sürüklenmesi için 10 dakika beklenmiş ve çıkartılarak kurutulmuştur. Kuruyan plak 1'er cm aralıklarla kesilerek gama sayıcıda sayılmıştır. Buradan albumine bağlı  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ile serbest  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  in Rf değerleri ve radyoaktivite yüzdeleri hesaplanmıştır.

#### II.2.4.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımları

In vivo deneyde kullanılmak üzere hazırlanan mikrokürelerin partikül büyüklüğü dağılımını saptamak amacıyla optik mikroskop yöntemi kullanılmıştır.<sup>175</sup> Mikroküreler, Tween-80 içinde ultrasonik banyoda tutularak tekdüze dağıtılmış ve 1000 partikül sayılarak ortalama partikül büyüklüğü saptanmıştır.

#### II.2.4.3. Deneyde Kullanılan Hayvanlar

Mikrokürelerin i.v.enjeksiyondan sonra organizmadaki

dağılımlarının in vivo olarak incelenmesi amacıyla her zaman aralığı için yaklaşık 30-35 g ağırlığındaki Swiss Albino cinsi fareler kullanılmıştır.

#### II.2.4.4. Deneyin Yapılışı

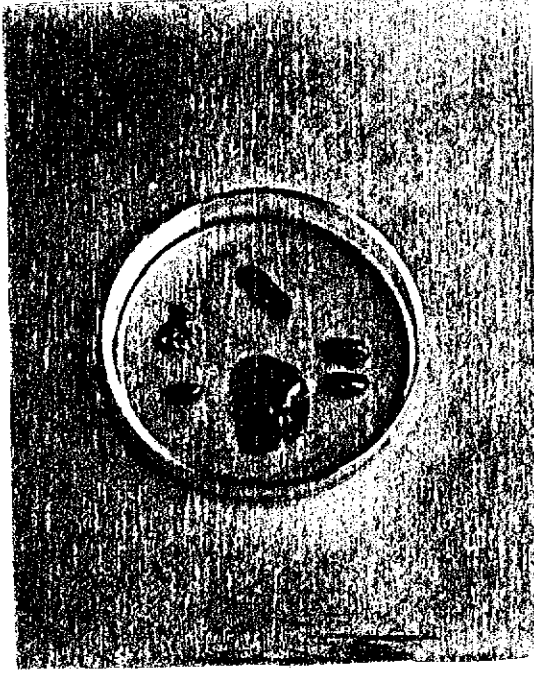
Enjeksiyondan hemen önce Bölüm II.2.4.1.2. ve II.2.4.1.3'deki yöntemlerle  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenmiş 10 mg mikroküre, % 0.1 h/h Tween-80 içeren 5 ml serum fizyolojik içinde süspande edilmiştir. Hazırlanan bu mikroküre süspansiyonundan her fareye kuyruk venası yoluyla 0.2 ml enjekte edilmiş ve 10, 60 dakika ile 4 ve 24 saat sonra boyunları kırılarak öldürülen hayvanların akciğerleri, karaciğeri, dalağı, böbrekleri ve kalbi çıkartılarak bekletilmeden ayrı ayrı tartılmıştır (Şekil 8). Tartılan organlar radyoaktivite sayımı yapılana kadar buzdolabında dondurularak saklanmıştır. 24. saatte son hayvan grubunun da organları çıkarılıp tartıldıktan sonra daha önceki organlarla birlikte ayrı ayrı tüplere konulmuş ve sayım yapmak üzere gama sayıcıya yerleştirilmiştir. Gama sayıcıda ölçüm yapılırken  $^{99m}\text{Tc}$ 'un gama enerjisine göre baseline 90 keV, pencere genişliği 100 keV olarak ayarlanmış böylece saçılmaların ve background'un büyük bir kısmının sayılması önlenmiştir. Farelere enjekte edilen dozdaki mikroküre süspansiyonunun total radyoaktivitesini saptayabilmek için bu süspansiyonun bilinen bir miktarı tüpe konarak organlarla birlikte sayılmıştır. Bu şekilde 5 tane standart sayım yapılmıştır. i.v. olarak verilen  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenmiş serbest streptomisin sülfatın organizmadaki dağılımının da mikrokürelerle karşılaştırılması amaçlandığından 2.5 ml %2 a/h streptomisin sülfat çözeltisinden 0.2 ml, farelere kuyruk venasından enjekte edilmiş ve 15 daki-



a)



b)



c)

Şekil 8 : In Vivo Deneyleerde Farelere Uygulanan İşlemler

a) Kuyruk venasına enjeksiyon

b) Fareler öldürüldükten sonra organlarının çıkarılması

c) Radyoaktivite sayımı yapmak üzere organların hazır hale getirilmesi



ka sonra boyunları kırılarak öldürülen hayvanların organları çıkartılmış ve gama sayıcıda radyoaktivite saptanmıştır.

#### II.2.4.5. Verilerin Gösterilişi

Yapılan standart sayımların ortalaması alınarak hayvanlara verilen total radyoaktivite saptanmıştır. Buna göre organlardaki radyoaktivite yüzdeleri ile gram doku başına radyoaktivite yüzdeleri hesaplanıp, ortalamaları alındıktan sonra standart hatalarıyla birlikte gösterilmiştir.<sup>172</sup>

### III. BULGULAR

Bu bölümde, kimyasal ve fizikokimyasal deneylerin bulguları, mikrokürelerin özellikleri ve invitro salıverilmeye ilişkin bulgular ile mikrokürelerin organizmadaki dağılımına ilişkin invivo bulgular verilmiştir.

#### III.1. Kimyasal ve Fizikokimyasal İncelemelere Ait Bulgular

##### III.1.1. Streptomisin Sülfatın Standardizasyonu

###### III.1.1.1. U.V.Spektrumu

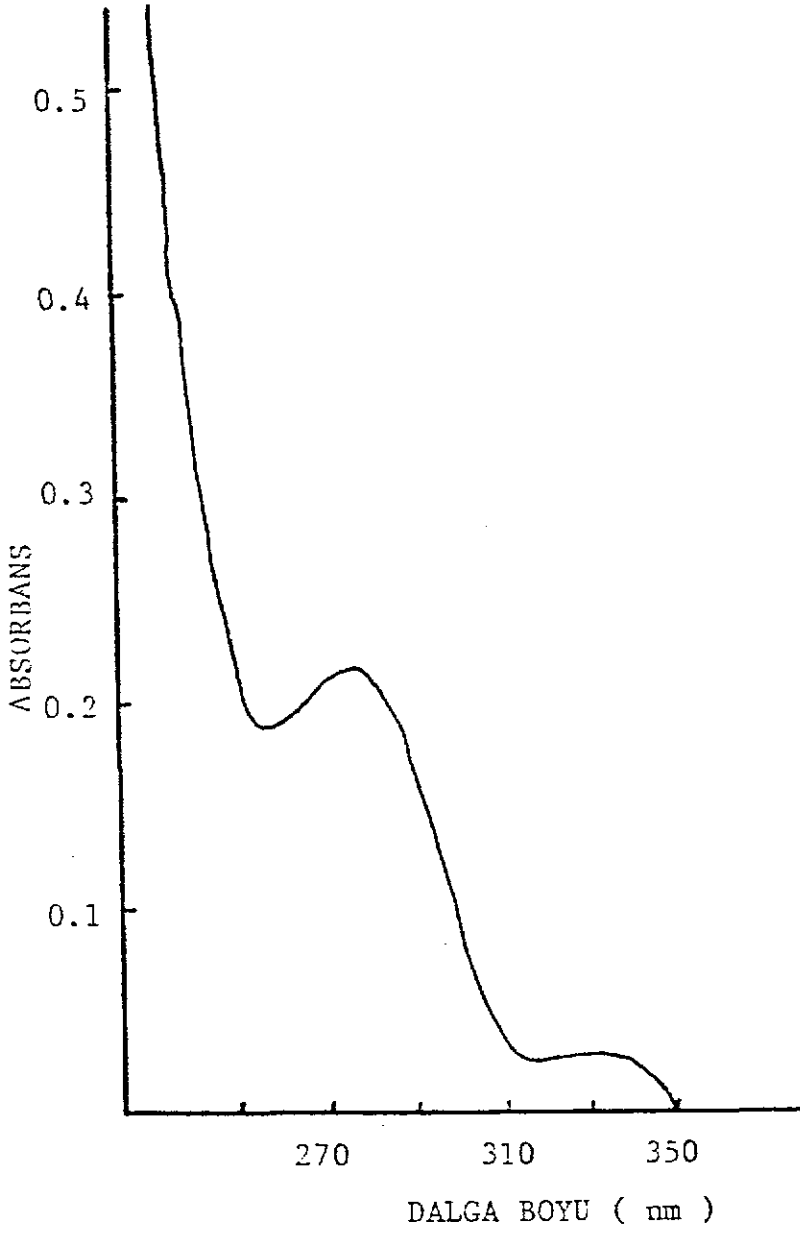
Streptomisin sülfatın U.V. spektrumu, Bölüm II.2.1.1.1.'de anlatıldığı şekilde 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de alındığında  $\lambda_{max}=278$  nm bulunmuştur (Şekil 9). Bulunan maksimum dalga boyu literatürle uyum göstermektedir.<sup>143</sup>

###### III.1.1.2. I.R.Spektrumu

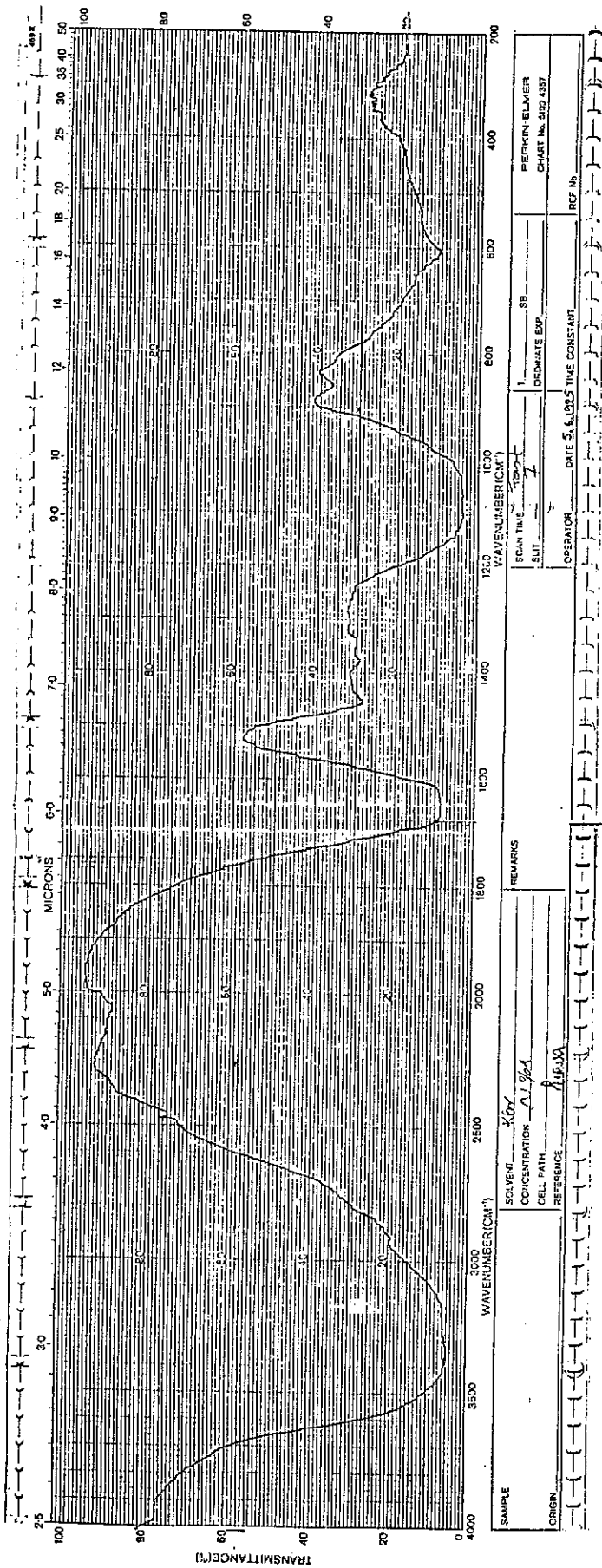
Streptomisin sülfatın 4000-250 cm<sup>-1</sup> aralığında potasyum bromür diskler arasında çekilen I.R. spektrumu Şekil 10'da görülmektedir. Maddenin 1670, 1300 1110 cm<sup>-1</sup> de saptanan absorpsiyon bandları literatürle uyum içindedir.<sup>177</sup>

###### III.1.1.3. Erime Noktası Tayini

Literatürde de belirtildiği gibi streptomisin sülfat'ın erime derecesi kesin olarak saptanamamıştır.<sup>144</sup>



Şekil 9 : 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> İçindeki %1 Streptomisin Sülfat'ın U.V. Spektrumu



SAMPLE	SOLVENT: <i>Kör</i>	SCAN TIME: <i>10:30</i>	DATE: <i>5. 1. 1965</i>	PERKIN-ELMER CHART No. 502 437
ORIGIN	CONCENTRATION: <i>1.1%</i>	ELIT	OPERATOR: <i>U. P. SA</i>	REF. No.
	CELL PATH	DECHARGE EXP	TIME CONSTANT	
	REFERENCE			
REMARKS				

Şekil 10 : Streptomisin Sülfat'ın I.R. Spektrumu

### III. 1.1.4. Partikül Büyüklüğü Dağılımı

Elek analizi yöntemi uygulanarak elde edilen partikül ağırlığı, %ağırlık, kümülatif % ağırlık dağılımı Tablo 6'da gösterilmiştir.

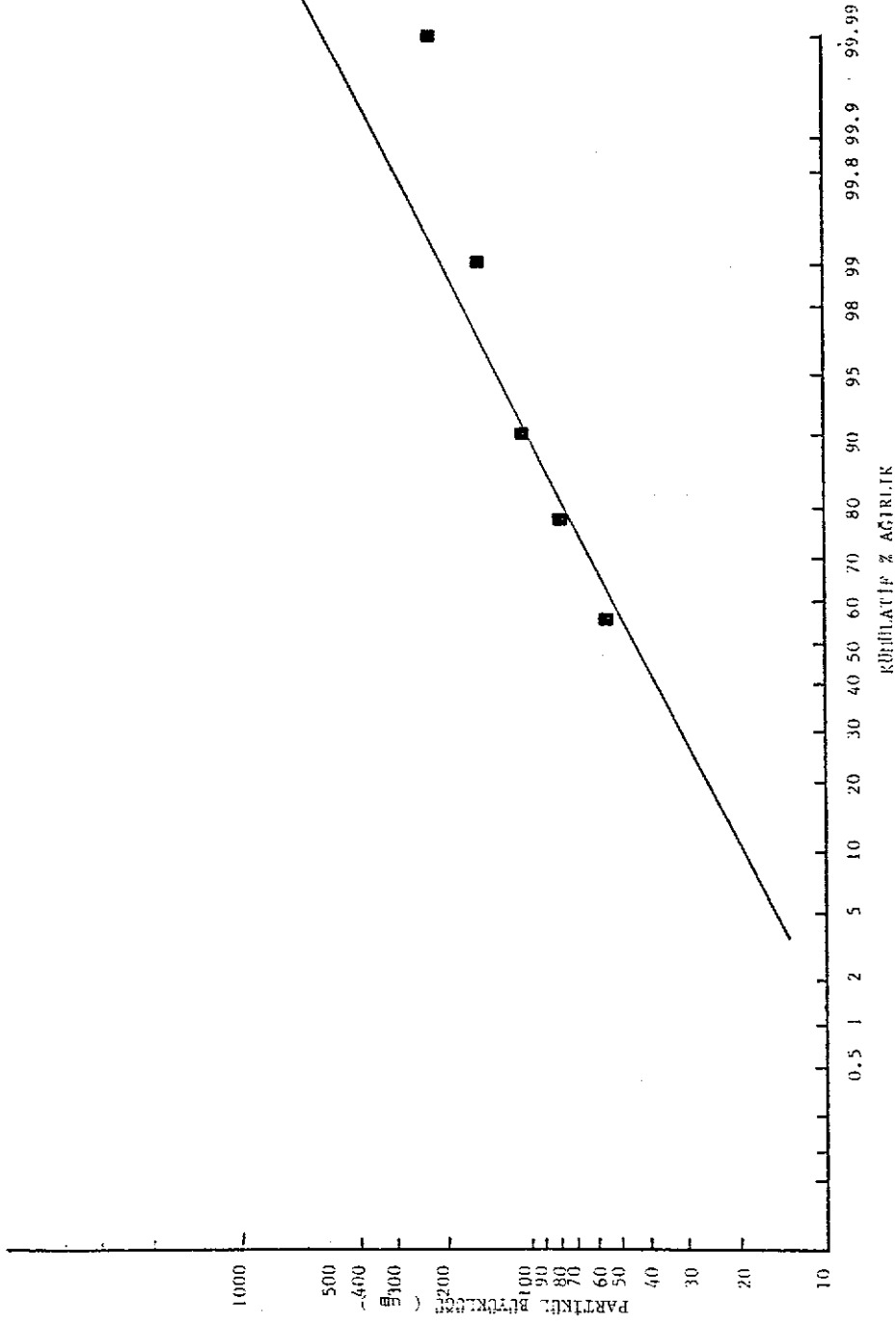
Tablo 6: Streptomisin Sülfat'ın Elek Analizi Yöntemi ile Elde Edilen Partikül Büyüklüğü Dağılımı Bulguları

Büyüklük Sınırları ( $\mu\text{m}$ )	Ortalama Büyüklük ( $\mu\text{m}$ )	Ağırlık(g)	%Ağırlık	Kümülatif % Ağırlık
0-45	22.5	6.76	13.643	13.643
45-63	54	21.21	42.805	56.448
63-90	76.5	10.72	21.635	78.083
90-125	107.5	6.64	13.401	91.484
125-180	152.5	3.72	7.507	98.991
180-250	215	0.50	1.009	100.00

Kümülatif % ağırlığın olasılık, partikül büyüklükleri logaritmik eksene çizilmiş ve ortalama partikül büyüklüğü  $46\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur (Şekil 11).

### III.1.1.5. Aktivite tayini

Streptomisin sülfat'ın mikrobiyolojik agar difüzyon yöntemiyle tayini sonucunda aktivitesi  $725 \text{ i.Ü/mg}$  bulunmuştur. Bu değer literatürle uyum içindedir<sup>168</sup>.



Şekil 11 : Streptomisin Sülfat'ın Elek Analizi Yöntemiyle Elde Edilen Partikül Büyüklüğü Dağılımı

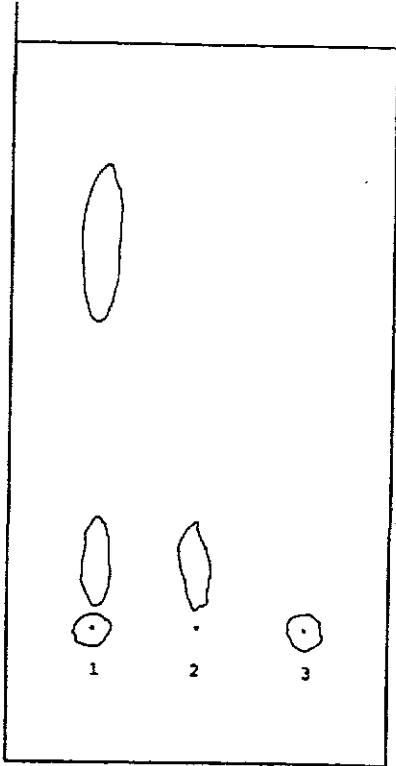
### III.1.1.6. İnce Tabaka Kromatografisi ile Tanınması

Streptomisin sülfat'ın farklı iki çözücü sistemi kullanılarak ince tabaka kromatografisi ile tanınması amacıyla Bölüm II.2.1.1.6 da anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalarda lekelerin sürüklenmediği saptanmış, bunun da literatürle uyum gösterdiği görülmüştür. <sup>143, 169, 178</sup>

### III.1.2. Streptomisin Sülfat'ın Stabilite Deneylerinin Bulguları

#### III.1.2.1. Streptomisin Sülfat'ın Parçalanma Ürünlerinin Kağıt Kromatografisi ile Ayrılması

Streptomisin sülfat'ın parçalanma ürünlerini ayırabilmek amacıyla kağıt kromatografisi yöntemi uygulanmıştır. <sup>170</sup> Bölüm II.2.1.2.1'de anlatılan işlemler uygulanarak elde edilen bulgular kromatogram 1 ve Tablo 7 de gösterilmiştir.



KROMATOGRAM 1 :  
Streptomisin Sülfat'ın Parçalanma Ürünlerinin Kağıt Kromatografisi ile Ayrılması

S & S Kromatografi Kağıdı

Adsorbant : (Nr.2040ax20741)

Çözücü Sistemi : n-Butanol : Piridin : Su

(16 : 32 : 12)

Oda sıcaklığı : 20°C

Uygulanan miktar : 10 µl

Sürüklenme mesafesi : 11 cm.

Uygulanan çözeltiler :

- 1) 0.2g streptomisin sülfat; 0.1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 2 ml metanol karışımında 2 dakika ısıtılarak parçalanması sağlanmış ve bu çözeltilerden uygulanmıştır.

- 2) 0.1ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 2ml metanol karışımı
- 3) % 0.1 a/h streptomisin sülfatın su-daki taze hazırlanmış çözeltilisi

- Belirteç: 1) Alkali gümüş nitrat  
çözeltisi  
2) U.V. 366 (1.belirteç  
püskürtüldükten son-  
ra incelenmiştir.)

Tablo 7 : Streptomisin Sülfat ve Parçalanma Ürünlerine İliş-  
kin Kağıt Kromatografisi Bulguları

Tatbik Edilen Çözeltiler						
Asid ile Hidrolizlenmiş		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ve Metanol		%0.1 a/h Streptomisin		
Streptomisin Sülfat		Karışımı		Sülfat'ın Sudaki Çözeltisi		
Çözeltisi						
Rf Değerleri	Leke Rengi	Rf Değerleri	L.Rengi	Rf Değerleri	Leke Rengi	
1	0.00	sarı	-	-	0.000	sarı
2	0.15	beyaz	0.15	beyaz	-	-
3	0.65	sarı	-	-	-	-
Zemin : Kahverengi						

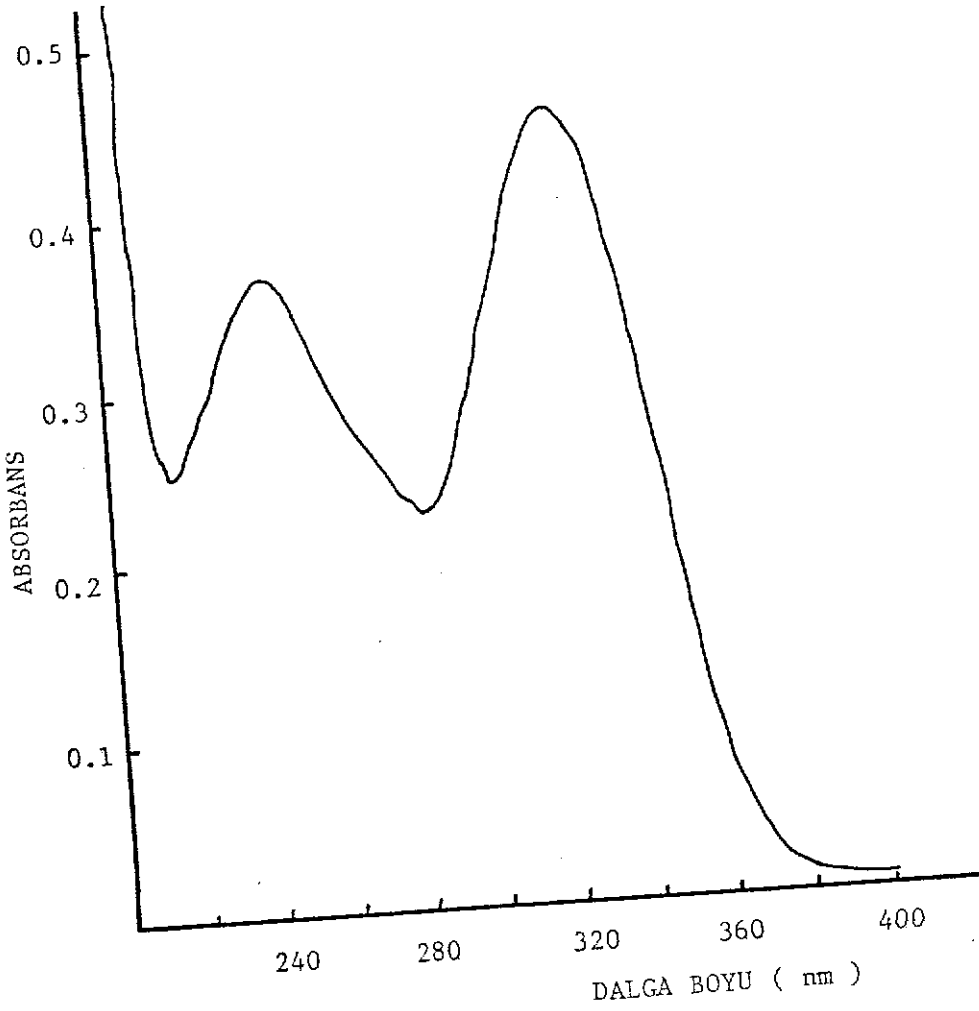
### III.1.2.2. Streptomisin Sülfat'ın In Vitro Salıverilmesi Sırasında Stabilitesinin İncelenmesi

Streptomisin sülfat'ın salıverilme ortamındaki stabilitesi Bölüm II.2.1.2.2 'de anlatıldığı şekilde incelenmiş, uygulanan örneklerin hiçbirisinin sürüklenmediği saptanmıştır.



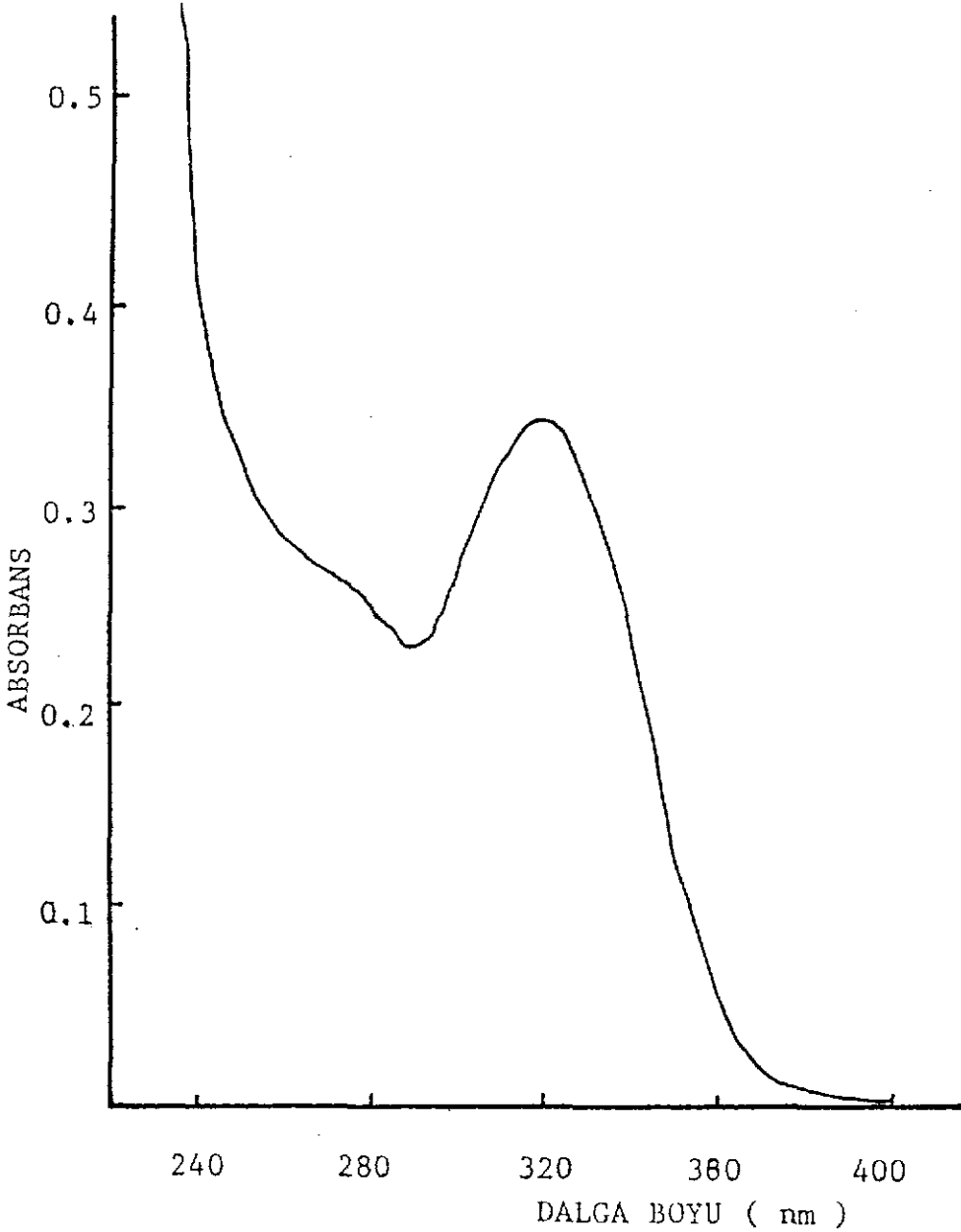
### III.1.3. Streptomisin Sülfat'ın Miktar Tayini

Streptomisin sülfat'a Bölüm II.2.1.3 'de anlatılan asid hidroliz uygulandıktan sonra elde edilen  $4.11 \times 10^{-5}$  M konsantrasyondaki streptomisin sülfat çözeltisinin U.V. spektrunu alındığında 320 ve 242 nm'de maksimum absorbands saptanmıştır (Şekil 12). Alınan bu spektrum, literatürle uyum içindedir.<sup>159</sup>

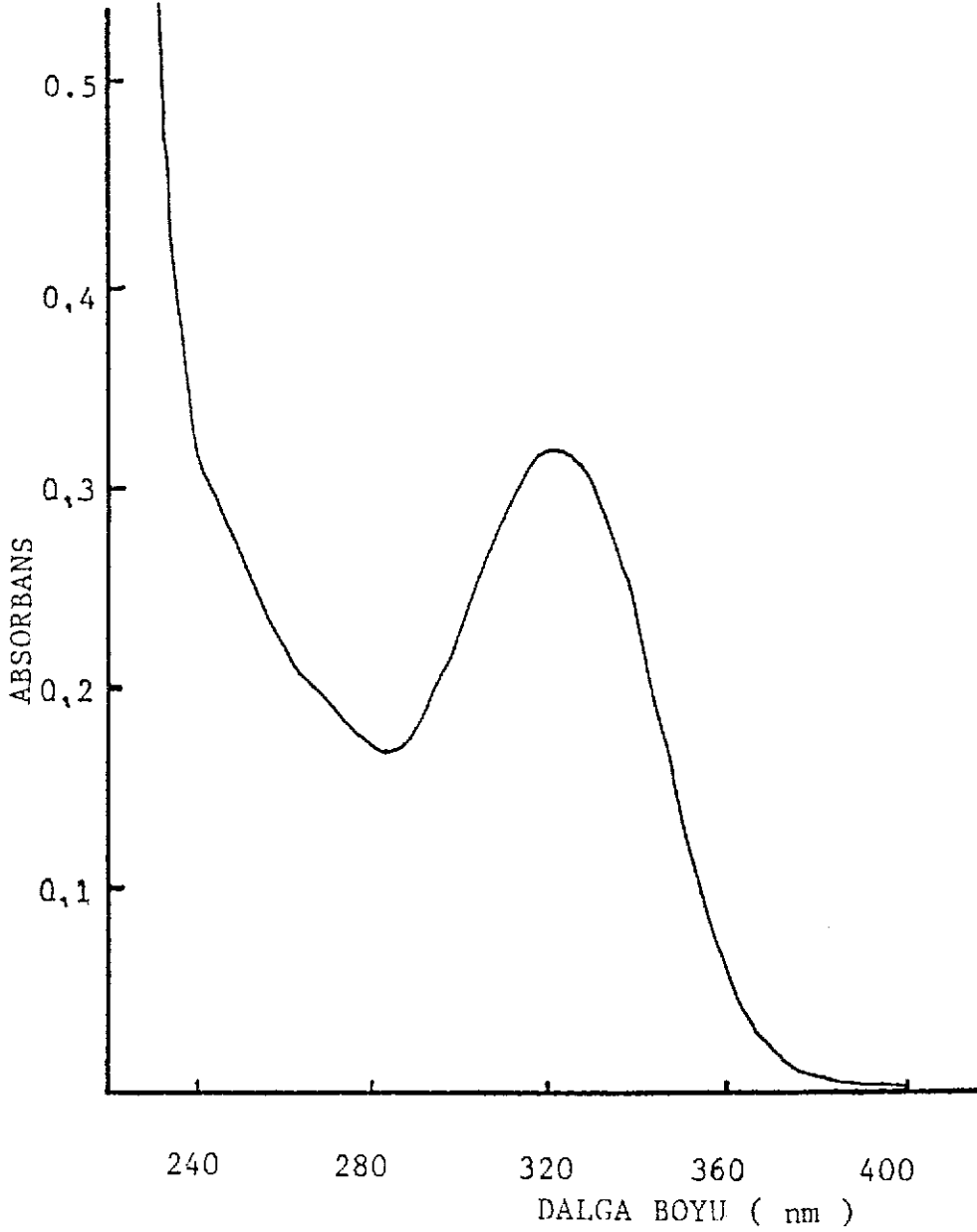


Şekil 12 : Asid Hidroliz Uygulanan Streptomisin Sülfat'ın  $4.11 \times 10^{-5}$  M Konsantrasyonda pH 7.4 İzotonik Fosfat Tamponu İçindeki U.V. Spektrumu.

Bölüm II.2.1.3 'de belirtildiği şekilde streptomisin sülfat içeren mikrokürelerden hareketle hazırlanan çözeltilerin U.V. spektrumları alınmış ve 320 nm'de maksimum absorbanans verdikleri saptanmıştır (Şekil 13 ve 14).



Şekil 13 : Streptomisin Sülfat İçeren 10 mg Albumin Mikrokürelerine Asid Hidroliz Uygulandıktan Sonra pH 7.4 izotonik Fosfat Tamponu İçindeki U.V. Spektrumu.



Şekil 14 : Streptomisin Sülfat İçeren 10 mg Jelatin Mikrokü-  
relerine Asid Hidroliz Uygulandıktan Sonra pH 7.4  
İzotonik Fosfat Tamponu İçindeki U.V. Spektrumu.

Matriks maddeleri olan albumin ve jelatinin çalışılacak olan 320 nm 'de streptomisin sülfatın maksimum absorpsiyonuna etkisini araştırmak için Bölüm II.2.1.3 de anlatıldığı şekilde spektrum alınmıştır. Her iki matriks maddesinin de 320 nm de hemen hemen aynı ve çok düşük absorpsiyon gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 15,16) Streptomisin sülfatın 320 nm de tek başına verdiği absorbans (Şekil 12) ile albumin ve jelatin mikroküreleriyle birlikte verdiği absorban (Şekil 17, 18) arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunduğundan ( $p < 0.05$ ) (Tablo 8), boş albumin veya jelatin mikrokürelerinin 10 mg 'ndan hareketle asid hidroliz uygulanarak hazırlanan köre karşı çözeltilerin absorbanları 320 nm de okunmuş, standart eğri yardımıyla streptomisin sülfat miktarı hesaplanmıştır.<sup>172</sup>

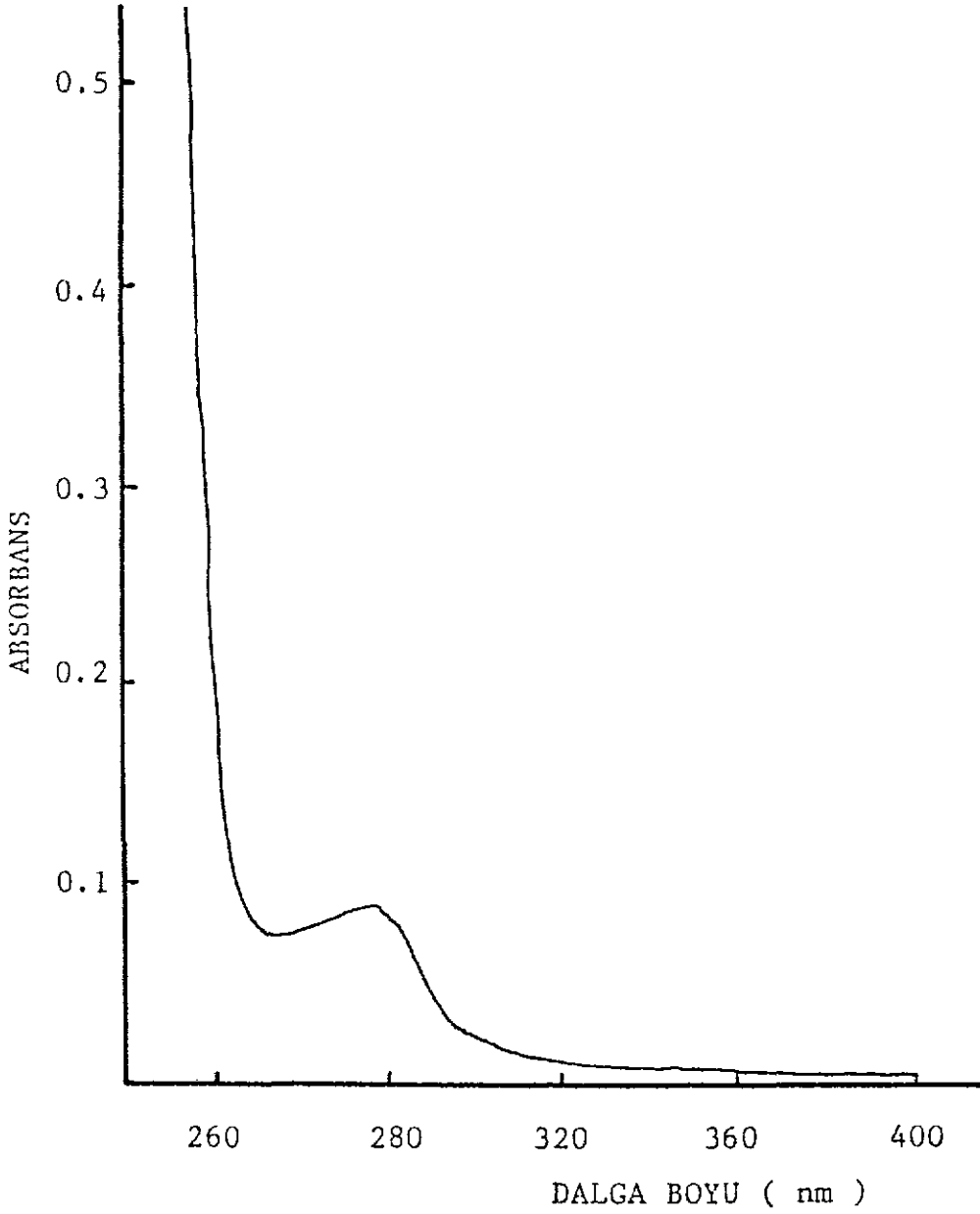
#### III.1.3.1. Standart Eğri

Streptomisin sülfat'ın mikrokürelerden in vitro salıverilmesi pH 7.4 izotonik fosfat tamponu ile yapıldığından, Bölüm II.2.1.3. 'de anlatıldığı şekilde asid işlem uygulandıktan sonra pH 7.4 izotonik fosfat tamponu kullanılarak  $\lambda_{max}=320$  nm'de çizilen standart eğri ve ilgili değerler Şekil 19 de verilmiştir.

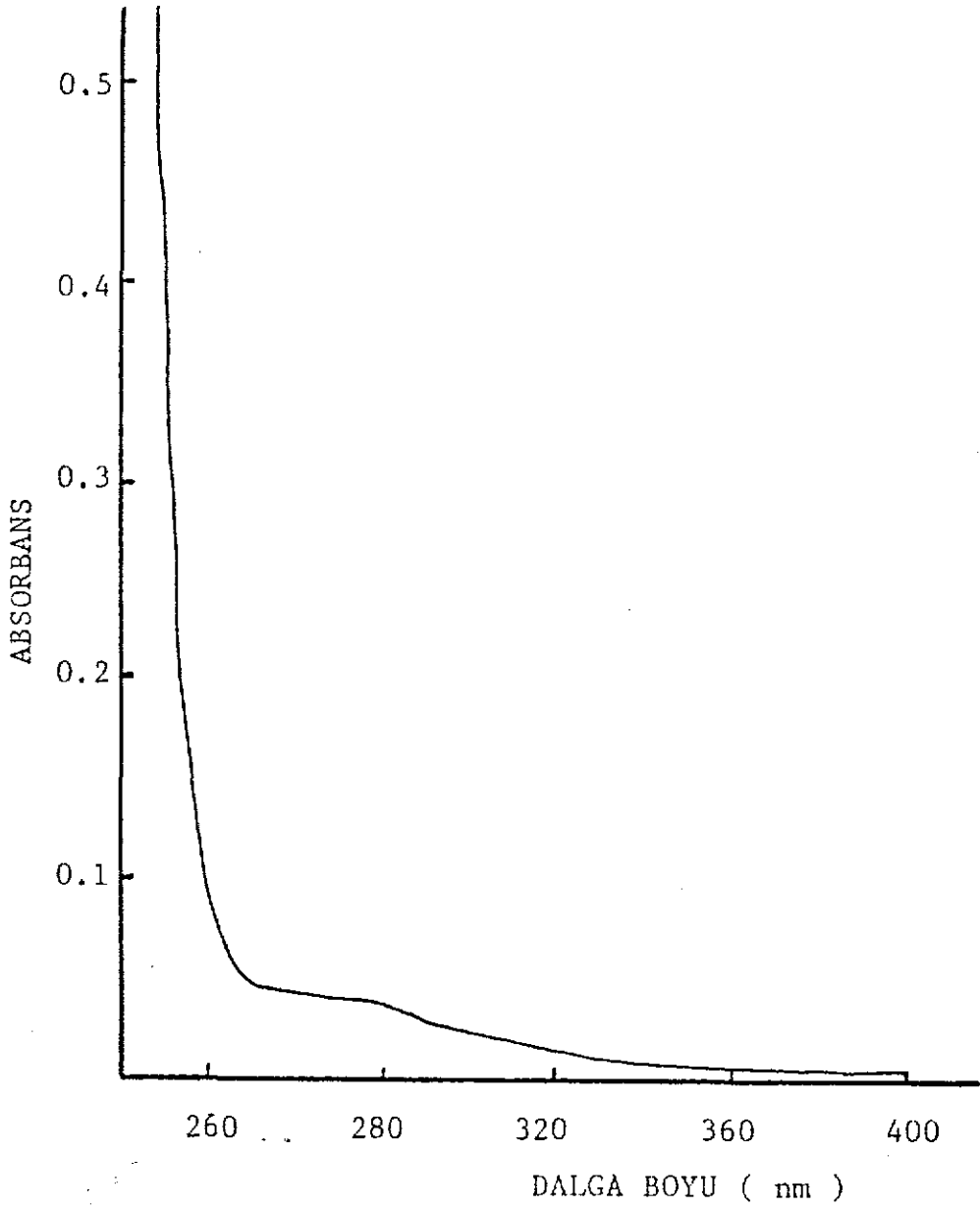
#### III.1.4. Matriks Maddelerin Standardizasyonu

##### III.1.4.1. Jelatinin İzoelektrik Noktası

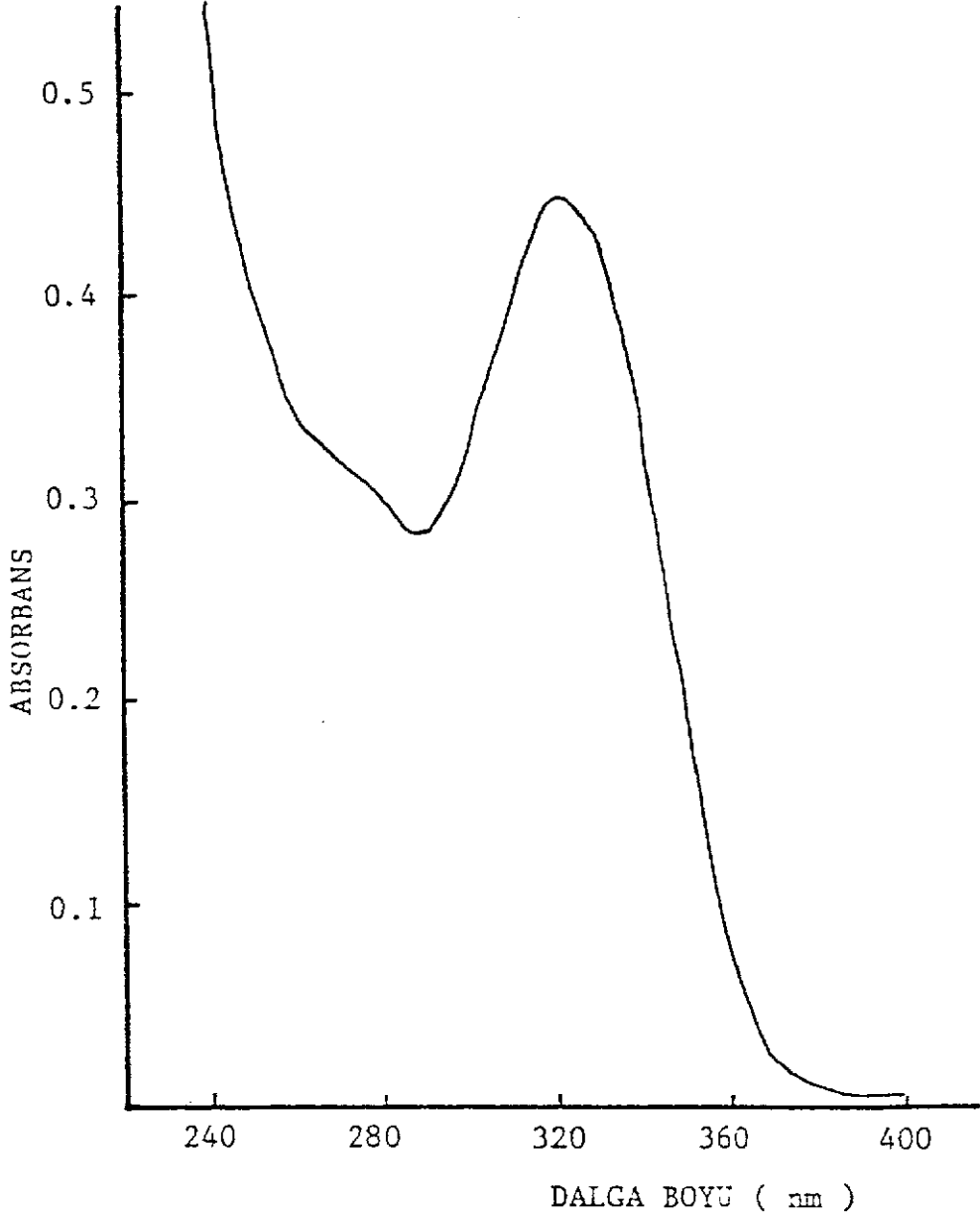
Jelatinin izoelektrik noktası, Bölüm II.2.1.4.1'de anlatılan yöntemle göre tayin edildiğinde 5.1 olarak bulunmuştur.



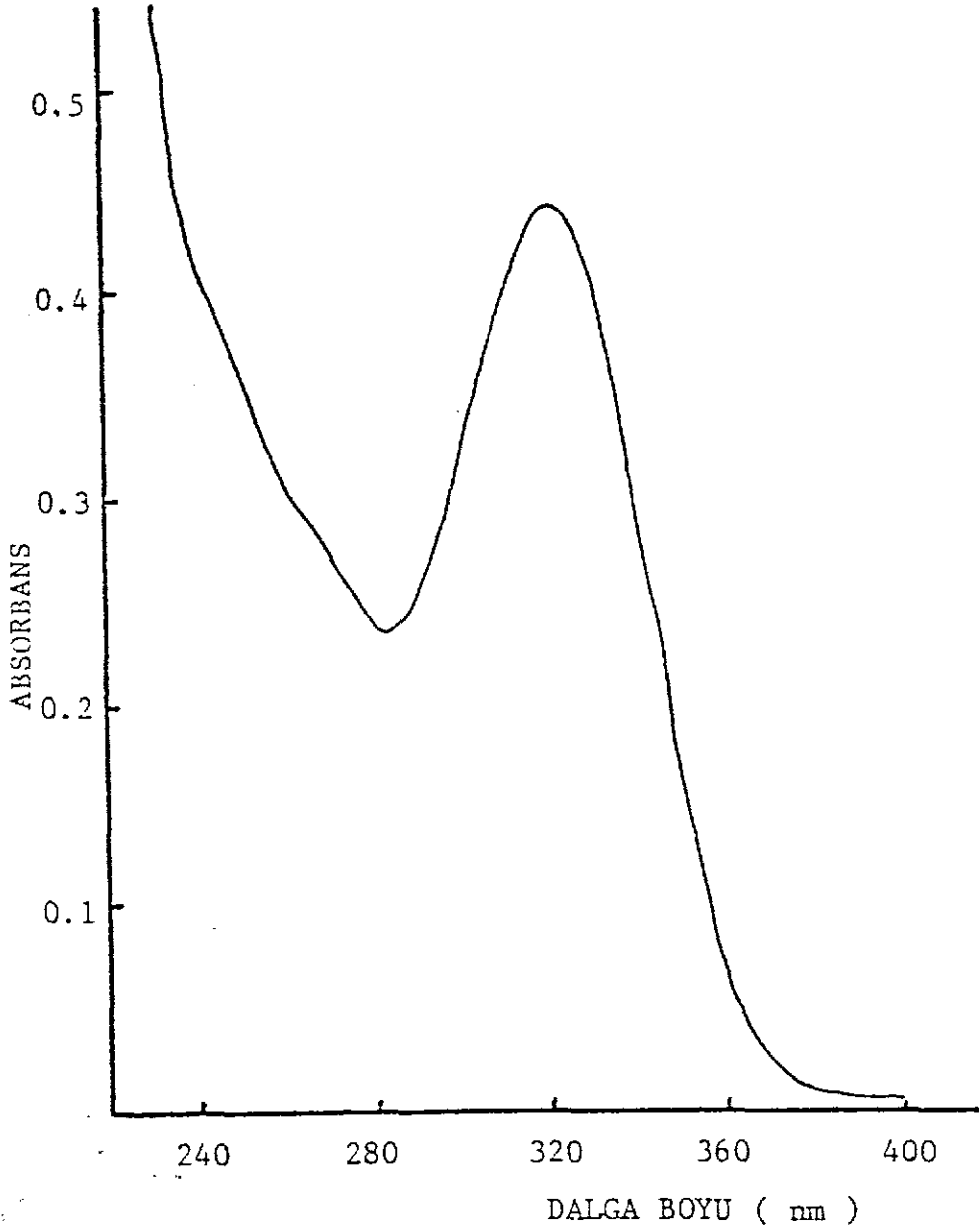
Şekil 15 : Etken Madde İçermeyen 10 mg Albumin Mikrokürelerine Asid Hidroliz Uygulandıktan Sonra pH 7.4 İzotonik Fosfat Tamponu İçindeki U.V. Spektrumu.



Şekil 16 : Etken Madde İçermeyen 10 mg Jelatin Mikrokürelerine Asid hidroliz Uygulandıktan Sonra pH 7.4 İzotonik Fosfat Tamponu İçindeki U.V.Spektrumu.



Şekil 17 : Asid Hidroliz Uygulanan 3 mg Streptomisin Sülfat ve 10 mg Albumin Mikroküre Karışımının pH 7.4 İzotonik Fosfat Tamponu İçindeki U.V. Spektrumu.



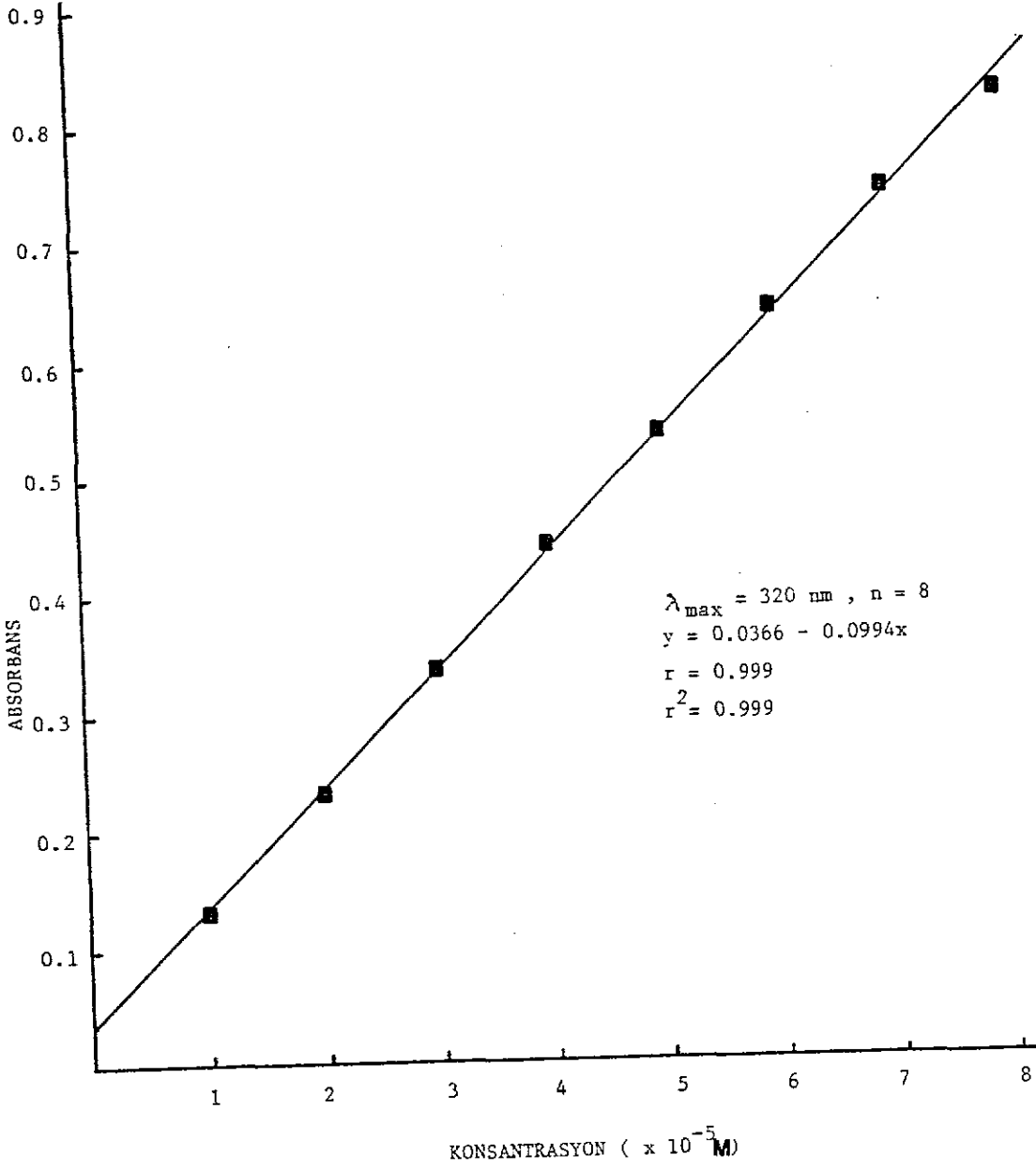
Şekil 18 : Asid Hidroliz Uygulanan 3 mg Streptomisin Sülfat ve 10 mg Jelatin mikroküre karışımının pH 7.4 izotonik Fosfat Tamponu içindeki U.V. Spektrumu.



Tablo 8 : Streptomisin Sülfat'ın Tek Başına, Albumin Mikroküreleriyle ve Jelatin Mikroküreleriyle Birlikte Verdiği Absorbansların Mann-Whitney U Testi ile Karşılaştırılmasına İlişkin Bulgular.

Çözelti İçeriği*	ABSORBANS		ABSORBANS		Önem Kontrolü
	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	V	
3 mg Streptomisin sülfat					$p < 0.05$
sülfat	0.430	0.00449	2.76	10mg Albumin mikroküre- ve 3mg Streptomisin sülfat	0.446 0.0015 0.913 fark vardır
3mg Streptomisin sülfat ve 10 mg Albumin mikro- küresi	0.446			3mg Streptomisin Sülfat ve 10mg Jelatin mikroküre- si	$p < 0.05$ fark vardır
3mg Streptomisin sülfat ve 10 mg Albumin mikro- küresi	0.446			3mg Streptomisin sülfat ve 10mg Jelatin mikroküre- si	$p > 0.05$ fark yoktur

n : 7 \*pH 7.4 izotonik fosfat tamponundaki çözelti (50 ml).



Şekil 19 : Asid Hidroliz Uygulanan Streptomisin Sülfat'ın pH 7.4 İzotonik Fosfat Tamponu İçindeki Standart Eğrisi

Bulunan bu değer alkali işlemle elde edilmiş (B tipi) jelatin olduğunu göstermektedir ve literatürde verilen değer ile uyum içindedir.<sup>179,180, 181, 182</sup>

#### III.1.4.2. Albuminin İzoelektrik Noktası

Albuminin İzoelektrik Noktası Bölüm II.2.1.4.2'de anlatılan şekilde tayin edildiğinde 5.1 olarak bulunmuştur. Bu değer literatürle uyum göstermektedir.<sup>182</sup>

#### III.1.5. Kullanılan Bitkisel Yağların Standardizasyonu

##### III.1.5.1. Pamuk ve Mısır Yağının Viskoziteleri

Bölüm II.2.1.5.1'de anlatılan şekilde pamuk yağı ve mısır yağının viskoziteleri saptanmış (Tablo 9), kayma gerilimi ile kayma hızının doğru orantılı olarak değiştiği görüldüğünden her iki yağın da Newtonian akış özelliği gösterdiğine karar verilmiştir.

Tablo 9 : Mikrokürelerin Hazırlanmasında Kullanılan Bitkisel Yağların Viskoziteleri

Yağ	Viskozite (m Pa .s)	
	25°C	40°C
Pamuk Yağı	52	31
Mısır Yağı	51	33

### III.2. Hazırlanan Mikrokürelere Ait Bulgular

#### III.2.1. Mikrokürelerin Özellikleri

##### III.2.1.1. Şekil ve Büyüklükleri

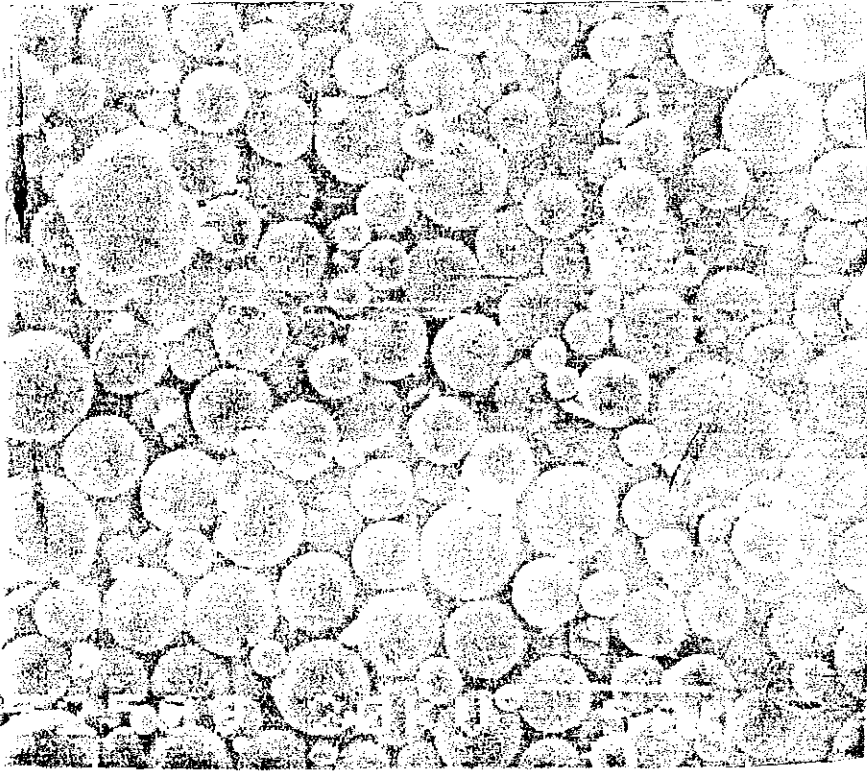
Albumin ve jelatin mikrokürelerinin taramalı elektron mikroskopunda fotoğrafları çekilerek şekilleri incelenmiştir. (Şekil 20 ve 21). Çekilen fotoğraflarda mikrokürelerin düzgün küresel şekle ve hemen hemen tekdüze bir büyüklük dağılımına sahip oldukları, ayrıca ortalama partikül büyüklüklerin de yaklaşık 30  $\mu\text{m}$  civarında olduğu görülmektedir.

##### III.2.1.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımları

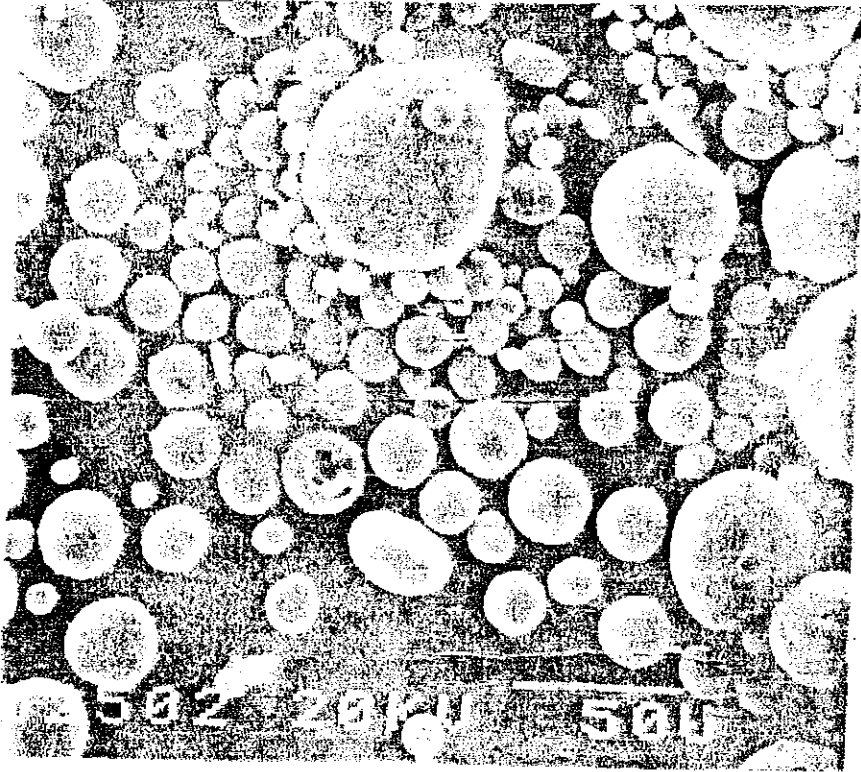
Albumin ve Jelatin mikrokürelerinin partikül büyüklüğü dağılımları Bölüm II.2.2.2.2.'de belirtildiği şekilde optik mikroskop yöntemiyle incelenerek ortalama partikül büyüklükleri tesbit edilmiş ve bulgular aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

Albumin mikrokürelerinin partikül büyüklüğü dağılımına ilişkin bulgular Tablo 10 da verilmiştir. Çizilen log-olasılık eğrisinden ise ortalama partikül büyüklüğü 29  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur (Şekil 22).

Jelatin mikrokürelerinin partikül büyüklüğü dağılımına ilişkin bulgular Tablo 11 de verilmiştir. Çizilen log-olasılık eğrisinden ise ortalama partikül büyüklüğü 31  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur (Şekil 23).



Şekil 20 : Albumin Mikrokürelerinin Taramalı Elektron Mikroskopunda Görünüşü



Şekil 21 : Jelatin Mikrokürelerinin Taramalı Elektron Mikroskopunda Görünüşü

Tablo 10 : Albumin Mikrokürelerinin Optik Mikroskop ile Elde Edilen Partikül Büyüklüğü Dağılımına İlişkin Bulgular

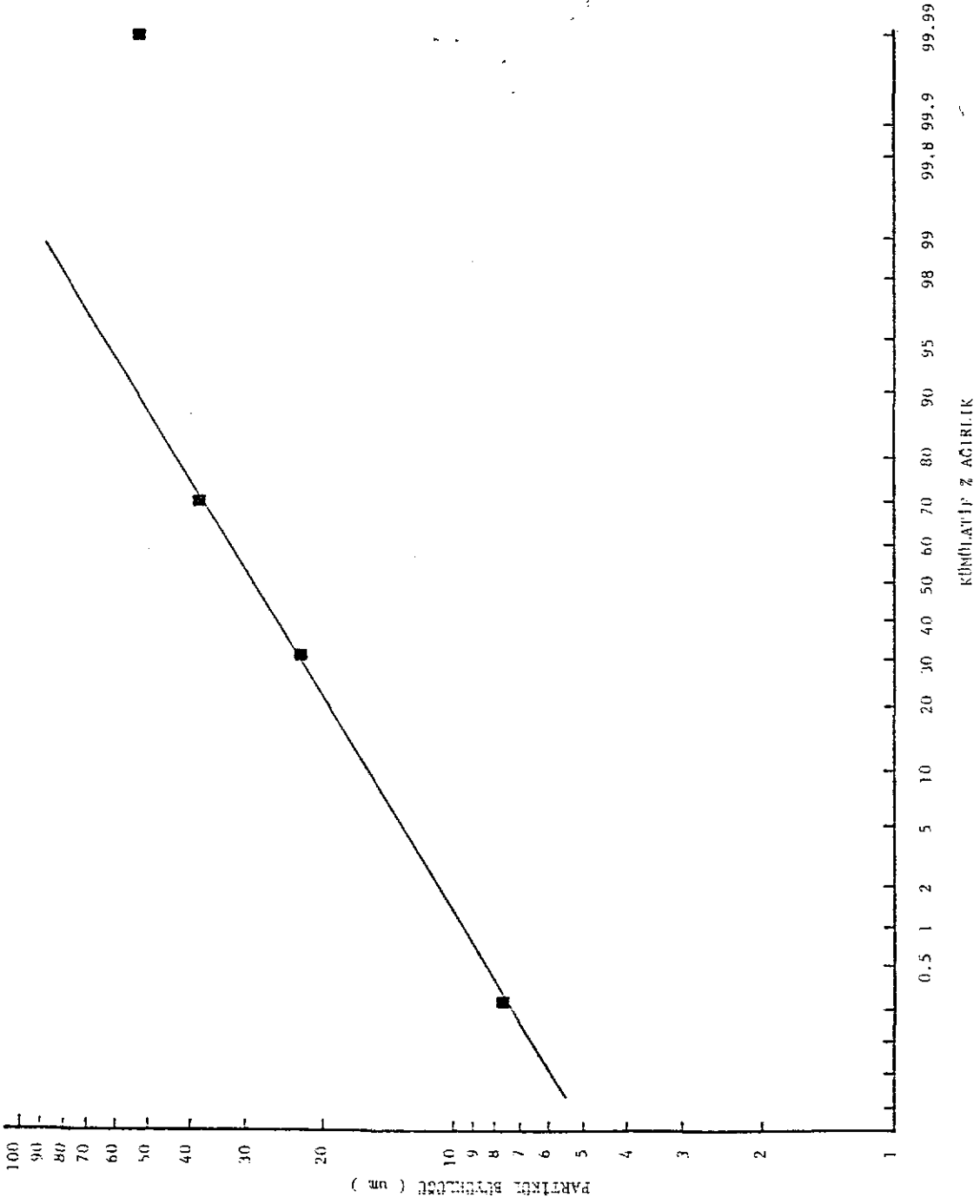
Büyüklük Sınırları	Ortalama büyüklük	Partikül Sayısı(n)	%n	Küm % n	Küm % Ağ
0-15	7.5	150	15	15	0.268
15-30	22.5	622	62.2	77.2	30.307
30-45	37.5	180	18	95.2	70.552
45-60	52.5	48	4.8	100	100.00

Tablo 11 : Jelatin Mikrokürelerinin Optik Mikroskopla Elde Edilen Partikül Büyüklüğü Dağılımına İlişkin Bulgular

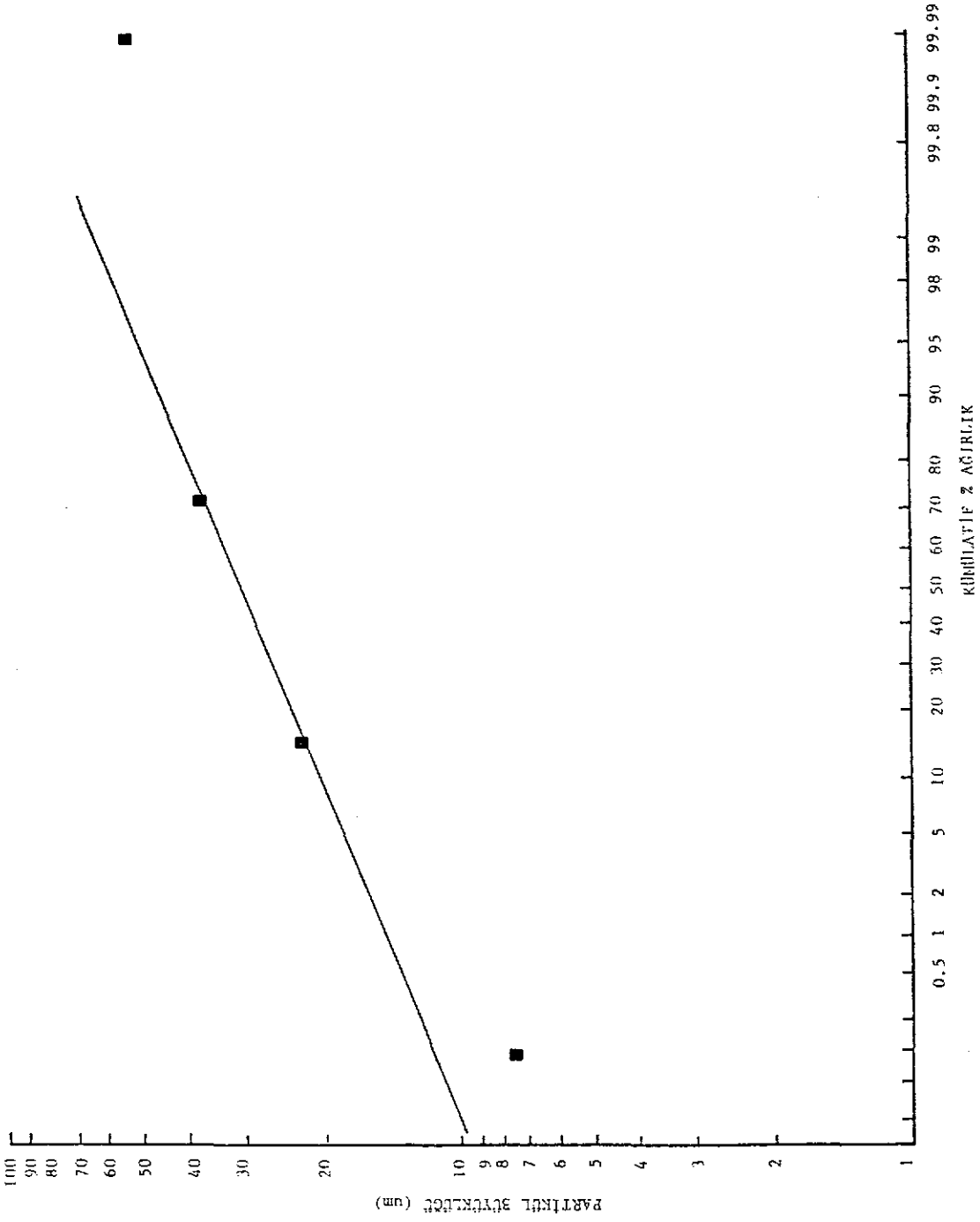
Büyüklük Sınırları	Ortalama büyüklük	Partikül Sayısı(n)	%n	Küm % n	Küm% Ağırlık
0-15	7.5	80	8	8	0.095
15-30	22.5	464	46.4	54.4	14.933
30-45	37.5	388	38.8	93.2	72.376
35-60	52.5	68	6.8	100	100.00

### III.2.1.3. Mikrokürelerdeki Streptomisin Sülfat Miktarı ve Mikroküre Hazırlama Verimi

Hazırlanan mikrokürelerdeki streptomisin sülfat miktarı, Bölüm II.2.1.3 ,de anlatılan şekilde spektrofotometrik o-



Şekil 22 : Albumin Mikrokürelerin Optik Mikroskop Yöntemiyle Elde Edilen Büyüklük Dağılımı



Şekil 23 : Jelatin Mikroürelerinin Optik Mikroskop Yöntemiyle Elde Edilen Büyüklük Dağılımı



olarak saptanmış ve bulgular Tablo 12 de verilmiştir. Bulunan değerler 6 ölçümün ortalamasıdır.

Mikroküreleri hazırlama verimi Bölüm II.2.2.2.3 'deki gibi hesaplanmış ve bulgular Tablo 12 de verilmiştir.

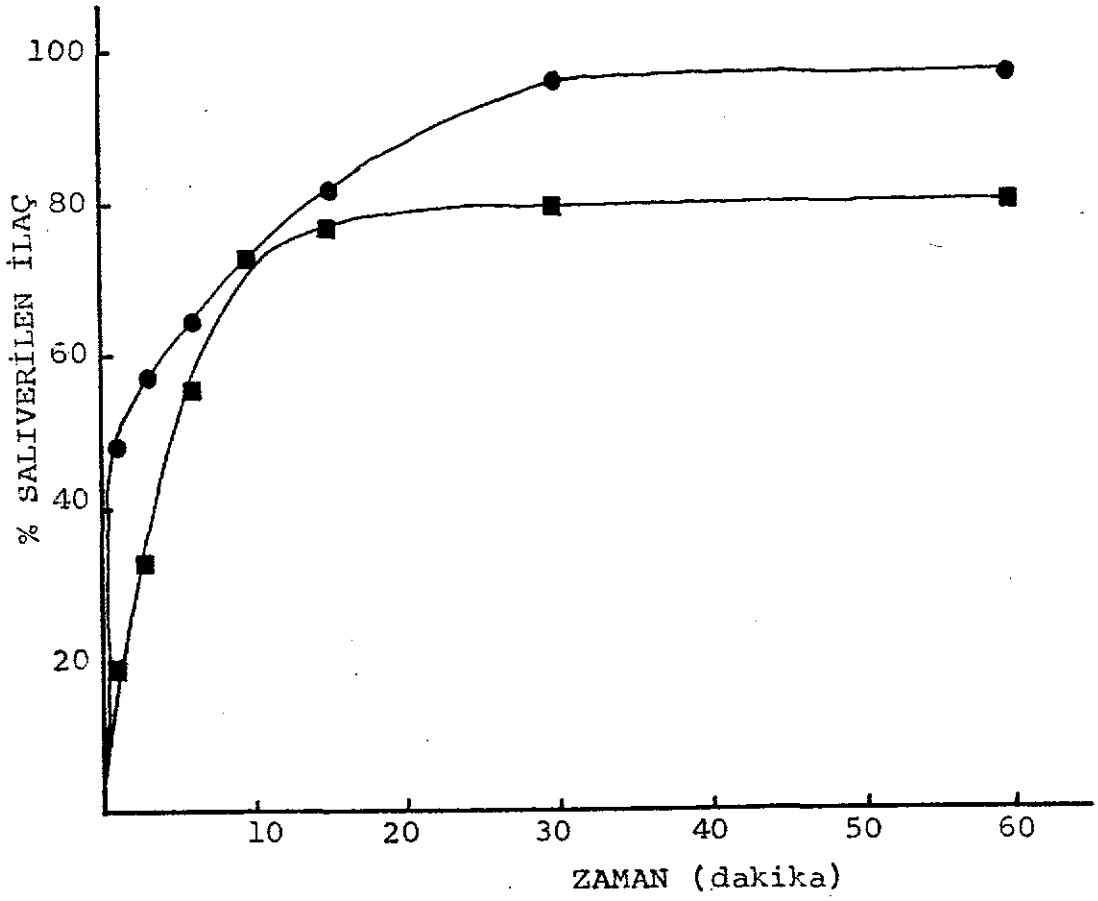
Tablo 12 : Hazırlanan Mikrokürelerdeki Streptomisin Sülfat Miktarı ve Mikrokürelerin Hazırlama Verimi.

Mikrokürelerin Cinsi	Streptomisin Sülfat Miktarı (%)	Mikroküre Hazırlama Verimi (%)
Albumin Mikroküreleri n=8	60.27	38.6
Jelatin Mikroküreleri n=4	61.42	78.7

### III.3. Streptomisin Sülfat'ın Mikrokürelerden In Vitro Salıverilmesine İlişkin Bulgular

#### III.3.1. Verilerin Gösterilişi

Bölüm II.2.4.5'de anlatıldığı şekilde belirli zaman aralıklarında salıverilen streptomisin sülfat miktarı hesaplanarak ortalamaları alınmış ve zamana karşı yüzde salıverilen etken madde miktarları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 24). Ayrıca bulgular Tablo 13 'te verilmiştir.



Şekil 24 : Mikrokürelerden Streptomisin Sülfat'ın Salıverilme Profilleri

■ : Albumin Mikrokürelere

● : Jelatin Mikrokürelere

### III.3.2. Deneylerin Tekrarlanabilirliği

Yapılan salıverilme deneylerinin tekrarlanabilirliği varyasyon katsayılarının hesaplanmasıyla kontrol edilmiştir. Tablo 13 'de görüldüğü gibi varyasyon katsayısının giderek azalması bulguların tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.<sup>172</sup>

Tablo 13 : Salıverilme Deneylerinin Bulgularının Tekrarlanabilirliği

Zaman (dakika)	Albumin Mikroküreleri n=6			Jelatin Mikroküreleri n=6		
	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	V	$\bar{x}$	$S_{\bar{x}}$	V
1	18.58	0.252	3.33	48.23	0.405	2.05
3	32.72	0.201	1.51	57.34	0.292	1.25
6	55.37	0.182	0.806	64.75	0.286	1.08
10	72.42	0.173	0.585	72.24	0.245	0.833
15	76.82	0.170	0.543	82.47	0.248	0.747
30	79.22	0.205	0.635	95.93	0.229	0.587
60	80.01	0.143	0.440	95.93	0.207	0.529

n=6

### III.4. Mikrokürelerin Organizmadaki Dağılımlarının İn Vivo İncelenmesine Ait Bulgular

#### III.4.1. <sup>99m</sup>Tc ile İşaretlemenin Kalite Kontrolü

Bölüm II.2.5.3 'de anlatıldığı şekilde yapılan işaretleme kalite kontrolü bulguları Tablo 14'de verilmiştir. Yapılan ince tabaka kromatografisi sonucunda, albumine bağlı <sup>99m</sup>Tc uygulama noktasında kaldığı halde (Rf=0) serbest <sup>99m</sup>Tc fronta kadar

sürüklenmiştir (Rf=1).<sup>103</sup>

Tablo 14 : <sup>99m</sup>Tc ile Yapılan İşaretlemenin Kalite Kontrol Bulguları

İşaretli Radyofarmasötik	<sup>99m</sup> Tc'in durumu	Rf	% Radyoaktivite
<sup>99m</sup> Tc-insan serum albumini *	Bağlı	0.0	96.0
	Serbest	1.0	4.0
<sup>99m</sup> Tc-insan serum albumini mikroküreleri	Bağlı	0.0	97.0
	Serbest	1.0	3.0

n=3, Adsorban: Gelman ITLC-SG, Çözücü sistemi: Aseton, Süre :10 dakika

\* Jelatin mikrokürelerinin işaretlenmesinde kullanılmıştır

#### III.4.2. Kullanılan mikrokürelerin Büyüklük Dağılımları

In vivo deneyde kullanılan albumin mikrokürelerinin büyüklük dağılımı bulguları Tablo 15 de verilmiştir Ortalama partikül büyüklüğü ise 32 µm olarak bulunmuştur (Şekil 25).

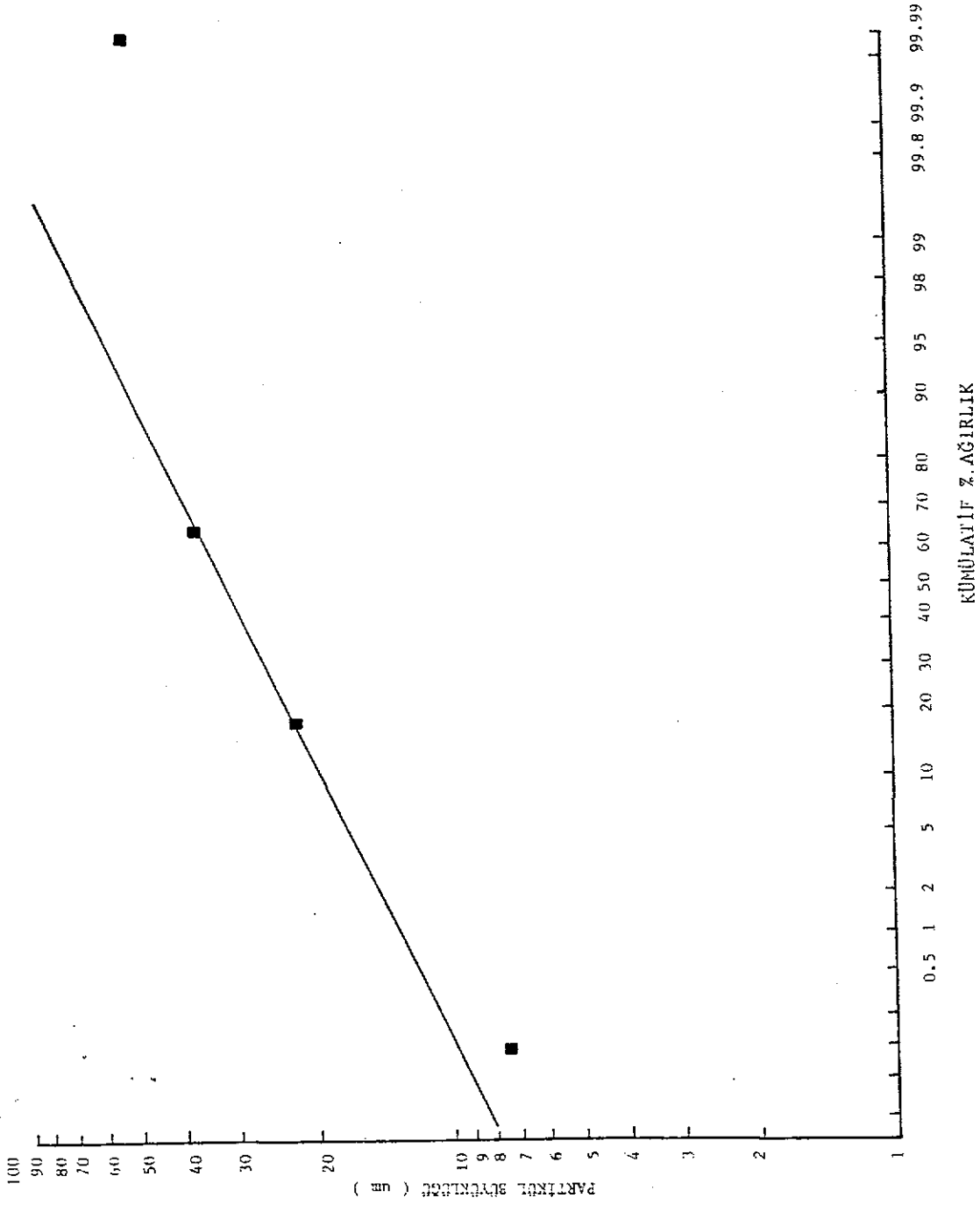
In vivo deneyde kullanılan jelatin mikrokürelerinin büyüklük dağılımı bulguları Tablo 16'da verilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü ise 30 µm olarak saptanmıştır(Şekil 26).

Tablo 15 : İn Vivo Deneyde kullanılan Albumin Mikrokürelerinin Optik Mikroskop Yöntemiyle Elde Edilen Büyüklük Dağılımı Bulguları

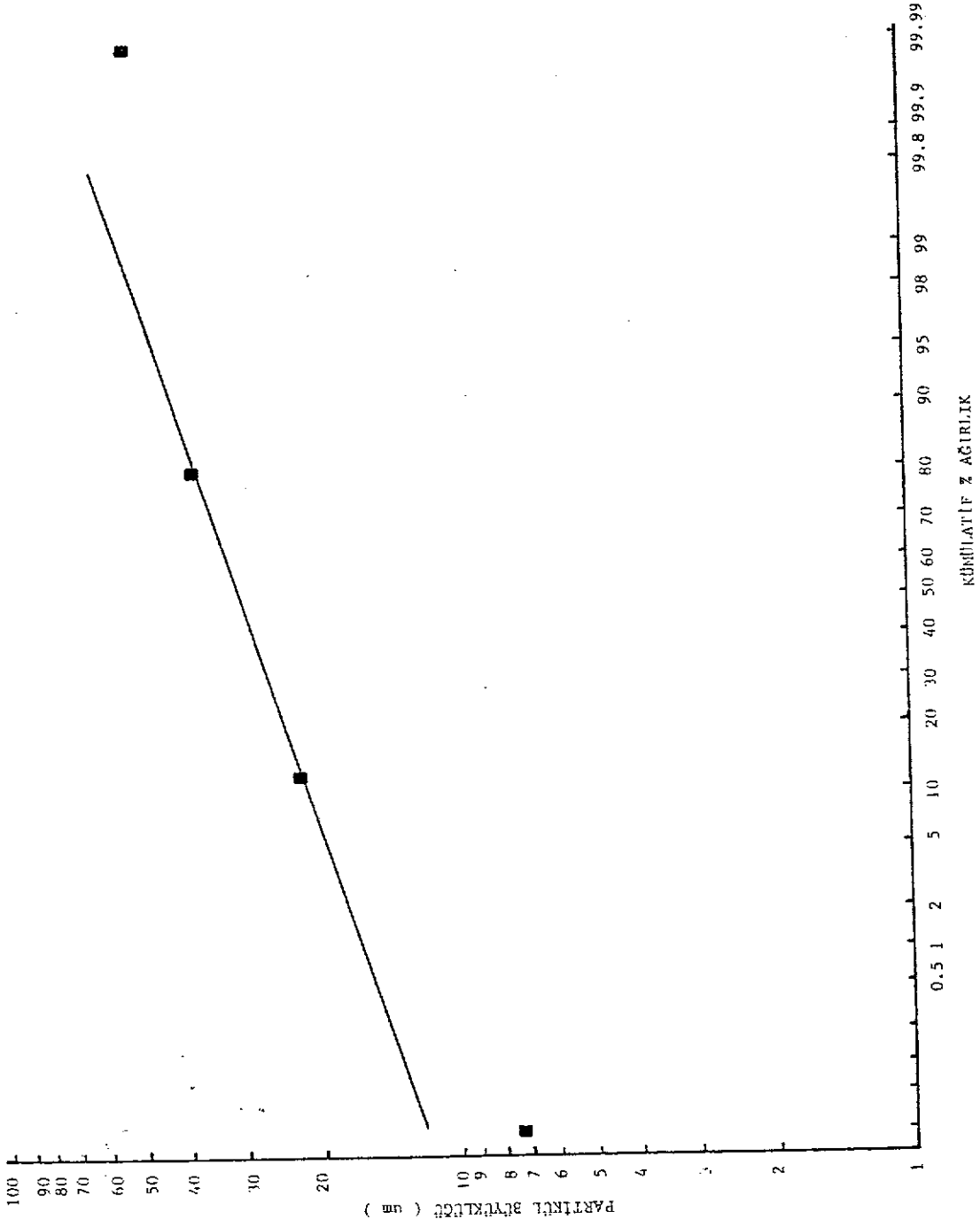
Büyüklük Sınırları ( $\mu\text{m}$ )	Ortalama Büyüklük ( $\mu\text{m}$ )	Partikül Sayısı(n)	% n	Küm % n	Küm% Ağırlık
0-15	7.5	76	7.6	7.6	0.094
15-30	22.5	538	53.8	61.4	17.991
30-45	37.5	302	30.2	91.6	64.502
45-60	52.5	84	8.4	100.0	100.0

Tablo 16 : İn Vivo Deneyde kullanılan Jelatin Mikrokürelerinin Optik Mikroskop Yöntemiyle Elde Edilen Büyüklük Dağılımı Bulguları

Büyüklük Sınırları ( $\mu\text{m}$ )	Ortalama Büyüklük ( $\mu\text{m}$ )	Partikül Sayısı(n)	% n	Küm % n	Küm% Ağırlık
0-15	7.5	11	1.1	1.1	0.012
15-30	22.5	433	43.3	44.4	12.586
30-45	37.5	502	50.2	94.6	80.078
45-60	52.5	54	5.4	100.0	100.0



Şekil 25 : *In Vivo* Denejde Kullanılan Albumin Mikrokürelerinin Optik Mikroskop Yöntemiyle Elde Edilen Büyüklük Dağılımı



Şekil 26 : In Vivo Denedeyde Kullanılan Jelatin mikrokürelerinin Optik Mikroskop Yöntemiyle Elde Edilen Büyüklük Dağılımı

### III.4.3. i.V. Olarak Verilen <sup>99m</sup>Tc ile İşaretli Serbest Streptomisin Sülfat'ın ve Mikrokürelerin Organizmadaki Dağılımlarının İn Vivo İncelenmesine Ait Bulgular

Serbest streptomisin sülfat'ın ve mikrokürelerin farklı organlardaki dağılımları Bölüm II.2.4.4'de anlatıldığı şekilde incelenmiştir.

#### III.4.3.1. Serbest Streptomisin Sülfat'ın İn Vivo Dağılım Verilerinin Gösterilişi

Yapılan çalışmada serbest streptomisin sülfatın karaciğerde yüksek düzeyde toplandığı saptanmıştır (Tablo 17, Şekil 27). Bu bulgu literatürle uyum içindedir.<sup>183</sup>

#### III.4.3.2. Albumin Mikrokürelerinin İn Vivo Dağılım Verilerinin Gösterilişi

İşaretli albumin mikrokürelerinin organlardaki dağılımına ait bulgular Tablo 18 ve Şekil 28,29 da gösterilmiştir.

#### III.4.3.3. Jelatin Mikrokürelerinin İn Vivo Dağılım Verilerinin Gösterilişi

İşaretli Jelatin mikrokürelerinin organlardaki dağılımına ait bulgular, Tablo 19 ve Şekil 30,31 de gösterilmiştir.

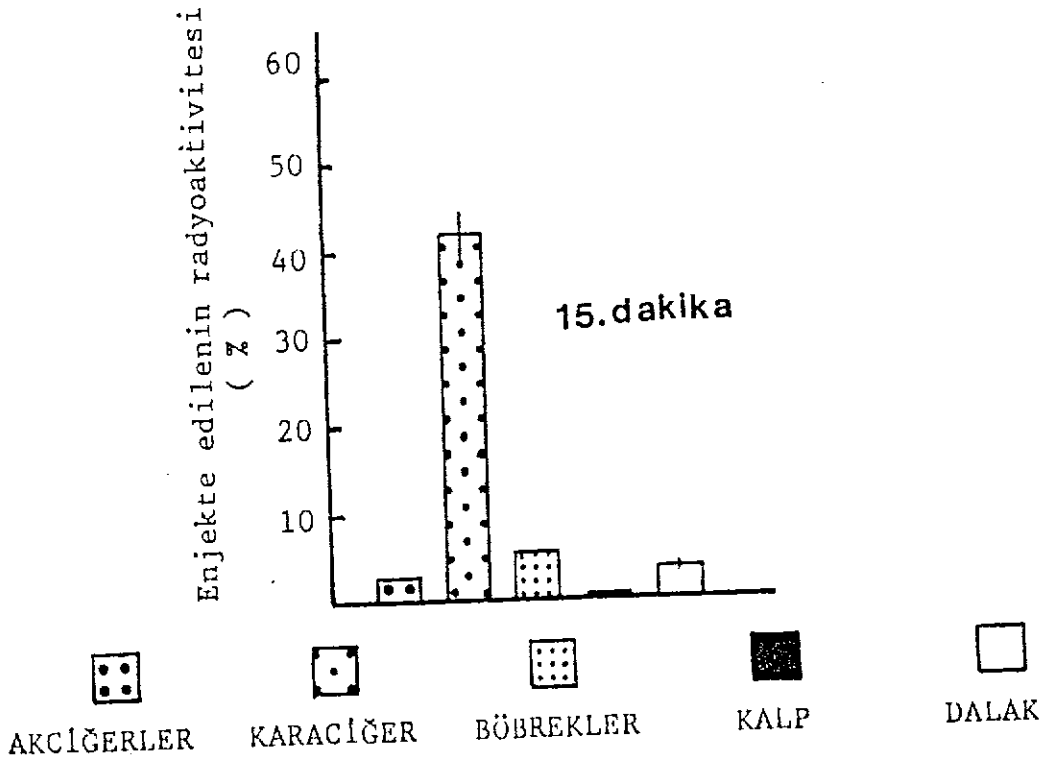


Tablo 17:  $^{99m}\text{Tc}$  ile İşaretli Serbest Streptomisin Sülfat'ın Organlardaki Dağılımına İlişkin Bulgular

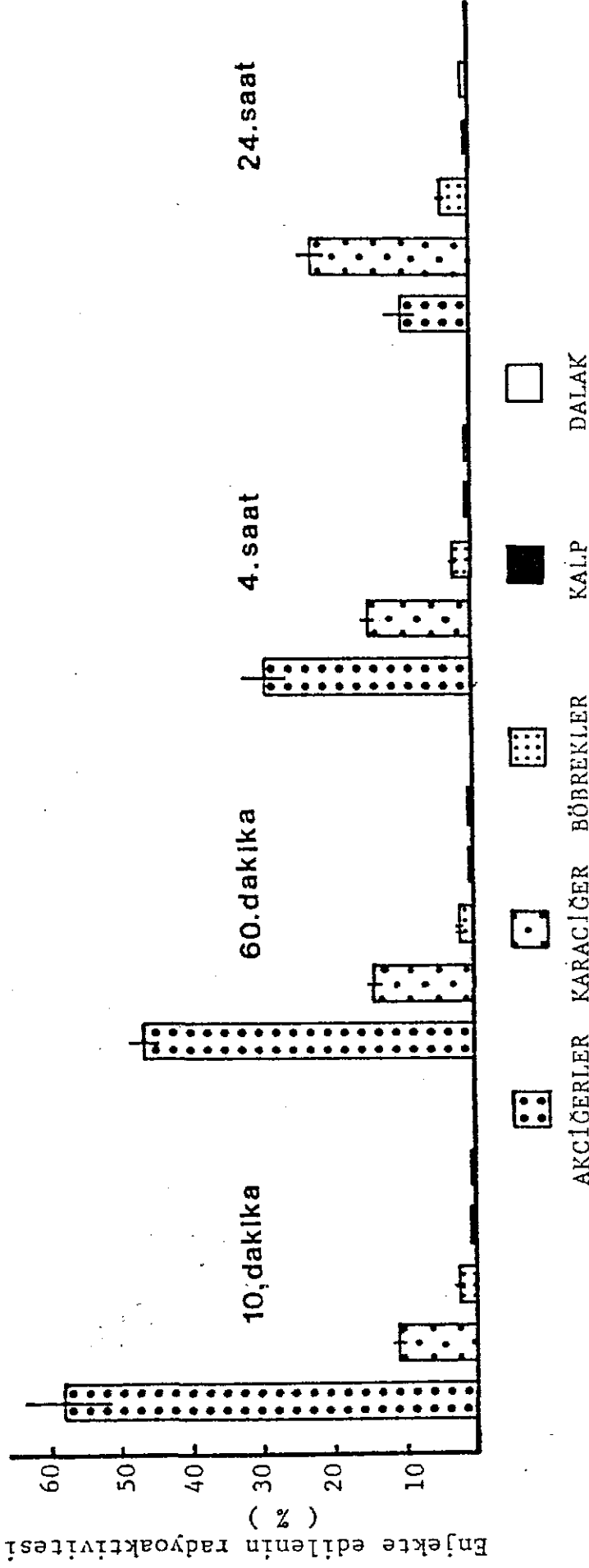
R A D Y O A K T İ V İ T E

ZAMAN	ORGAN	%	$S_x^-$	% / 9 organ	$S_x^-$
	KARACİĞER	42.0	1.89	23.0	2.60
	AKCİĞER	2.60	0.054	5.82	1.61
15. dak	BÖBREK	5.58	0.0474	9.35	1.44
	KALP	0.181	0.0683	1.00	0.247
	DALAK	3.40	0.540	14.1	1.78

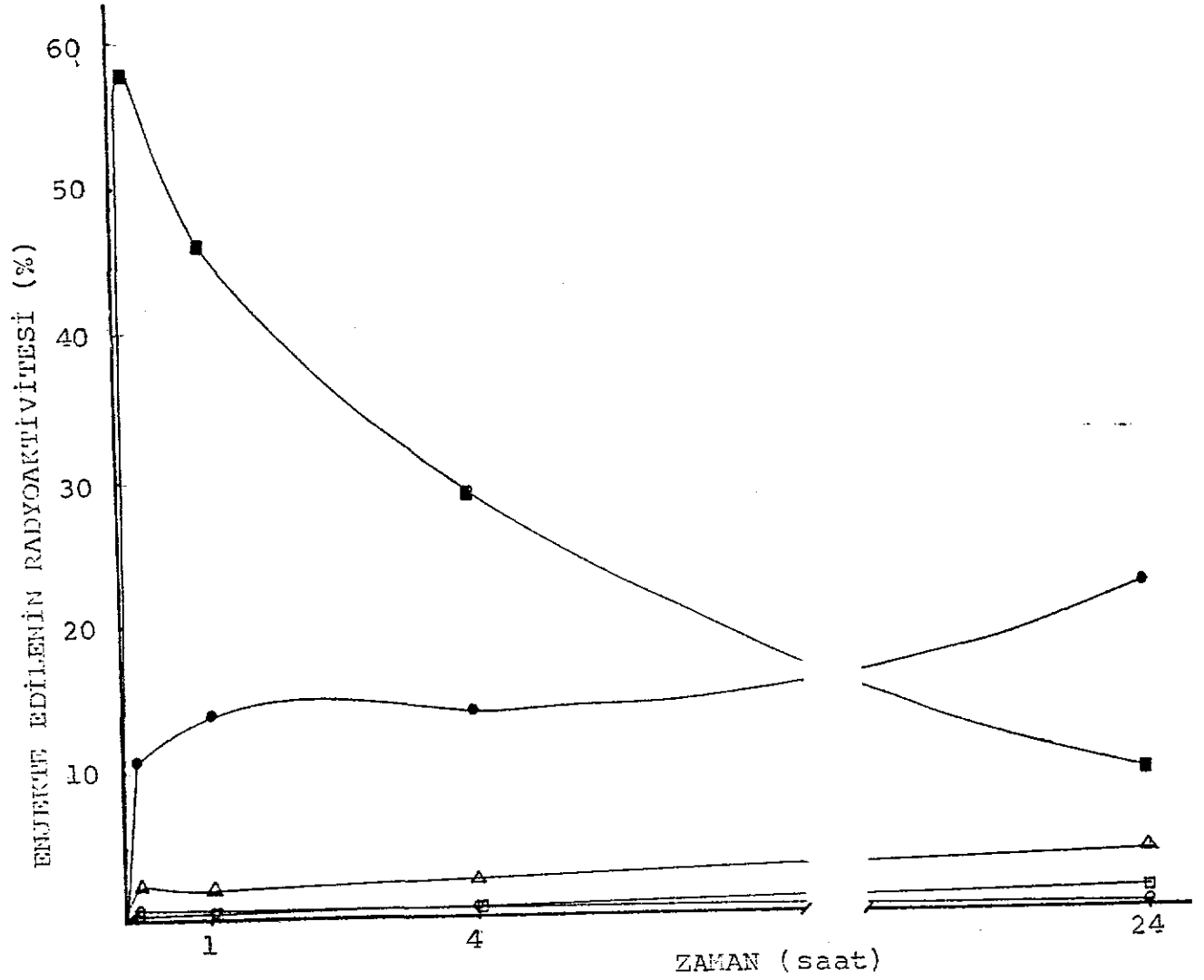
Her değer 2 hayvan üzerinde yapılan sayımların ortalamasıdır.



Şekil 27:  $^{99m}\text{Tc}$  ile İşaretli Serbest Streptomisin Sülfat'ın Organlardaki Dağılımı.



Şekil 28:  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenmiş Albumin Mikroglobulininin Organlardaki Dağılımı.



Şekil 29 :  $^{99m}\text{Tc}$  - Albumin Mikrokürelerinin Organlardaki Dağılımı

■ : Akciğerler

● : Karaciğer

△ : Böbrekler

○ : Kalp

□ : Dalak

Tablo 18:  $^{99m}\text{Tc}$ -Albumin Mikrokürelerinin i.v. Olarak Uygulanmasından Sonra Toplam Radyoaktivite-  
nin Çeşitli Organlardaki Dağılımı.

R A D Y O A K T İ V İ T E

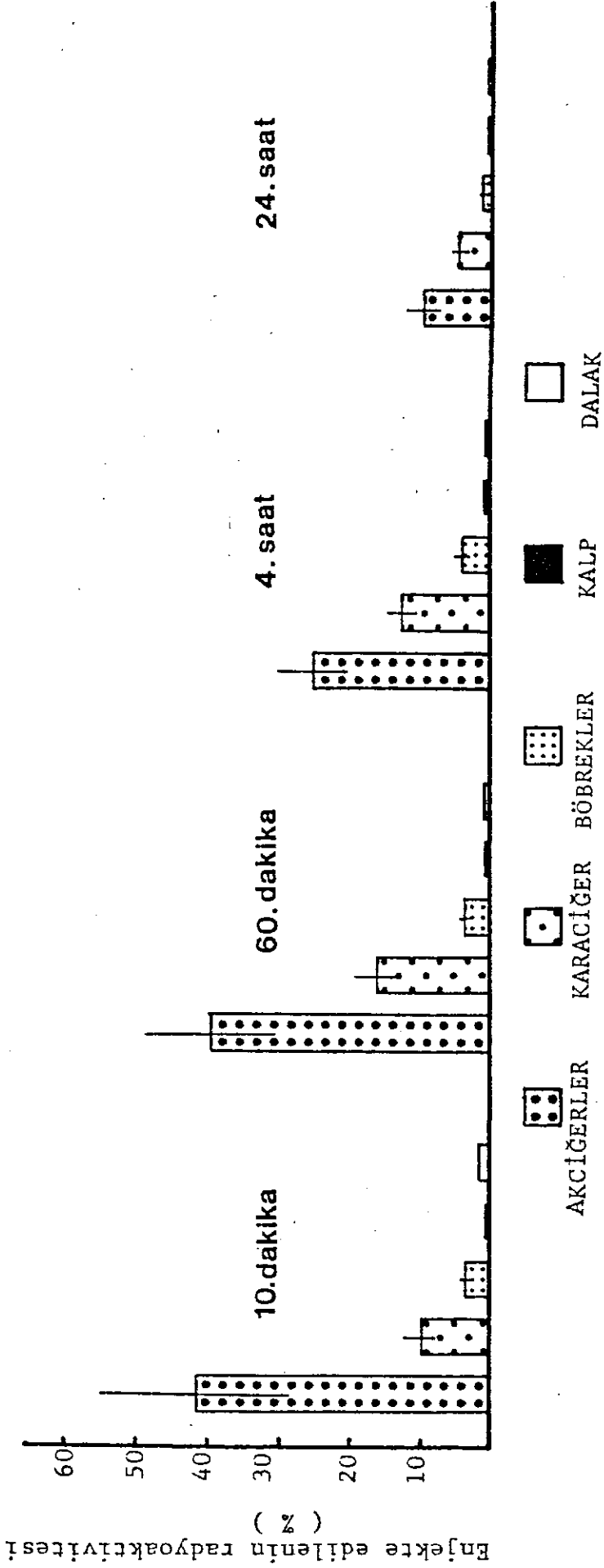
ZAMAN	ORGAN	%	$S_x^-$	% /g organ	$S_x^-$
	KARACİĞERLER	11.1	0.510	7.47	0.63
	AKCİĞER	58.2	5.93	161.5	20.6
10. dak.	BÖBREKLER	2.33	0.299	5.02	0.829
	KALP	0.586	0.104	3.57	0.556
	DALAK	0.475	0.066	2.70	0.172
	KARACİĞER	14.1	1.20	7.74	0.383
	AKCİĞERLER	46.3	2.06	128.8	15.8
60. dak	BÖBREKLER	2.14	0.255	4.77	0.451
	KALP	0.497	0.048	3.08	0.268
	DALAK	0.548	0,078	2.60	0.188
	KARACİĞER	14.3	1.30	8.27	1.36
	AKCİĞERLER	29.2	3.27	87.3	15.4
4. saat	BÖBREKLER	2.54	0.311	5.60	0.904
	KALP	0.532	0.0951	3.00	0.601
	DALAK	0.492	0.0422	3.03	0.440
	KARACİĞER	22.2	2.22	10.7	1.55
	AKCİĞERLER	9.46	2.60	28.0	9.95
24. saat	BÖBREKLER	3.91	0.395	7.20	1.09
	KALP	0.297	0.0286	1.52	0.222
(*)	DALAK	1.10	0.132	5.90	0.828

(\*) Her değer 10 hayvan üzerinde yapılan sayımların ortalamasıdır. 24. saat değerleri 9 hayvan üzerinde yapılan sayımların ortalamasıdır.

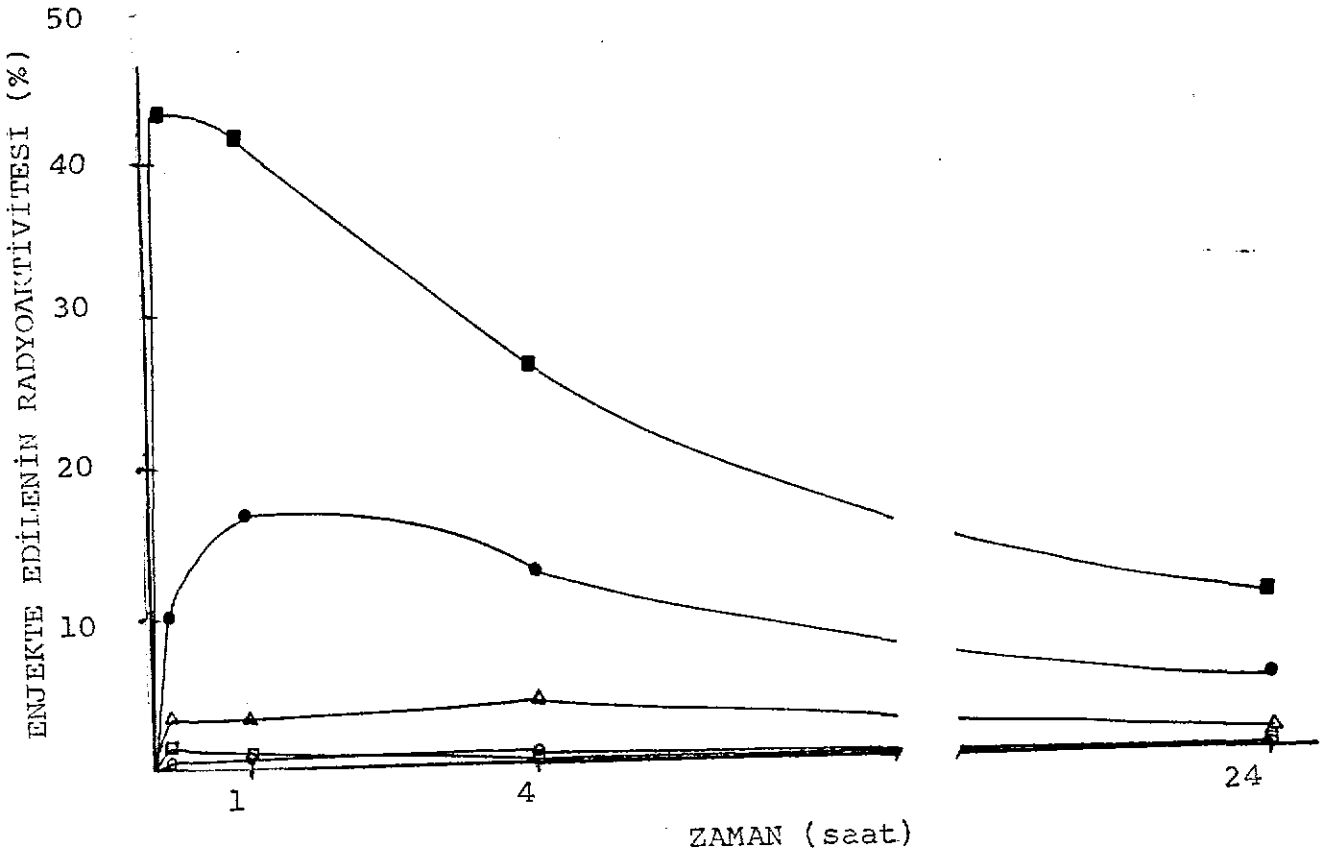
## RADYOAKTİVİTE

ZAMAN	ORGAN	%	$S_x$	%/9 organ	$S_x$
	KARACİĞER	9.67	2.09	5.30	1.19
	AKCİĞERLER	41.3	10.3	97.6	25.6
10. dak	BÖBREKLER	3.36	0.560	7.85	1.42
	KALP	0.421	0.113	3.21	0.957
	DALAK	1.51	0.658	5.30	1.95
	KARACİĞER	16.1	3.57	8.67	2.09
	AKCİĞERLER	39.5	9.34	120.4	31.0
60. dak	BÖBREKLER	3.32	0.602	7.25	1.14
	KALP	0.768	0.210	5.21	1.26
	DALAK	0.850	0.219	4.28	0.876
	KARACİĞER	12.2	2.91	5.6248	1.20
	AKCİĞERLER	25.2	5.26	85.6	17.6
4. saat	BÖBREKLER	4.00	1.14	7.42	2.06
	KALP	0.849	0.404	3.61	1.57
	DALAK	0.343	0.0706	2.03	0.363
	KARACİĞER	4.73	1.28	2.67	0.727
	AKCİĞERLER	9.72	2.55	33.47	11.2
24. saat	BÖBREKLER	1.26	0.368	3.14	0.961
	KALP	0.187	0.121	1.10	0.640
	DALAK	0.310	0.153	4.31	3.14

Her değer 10 hayvan üzerinde yapılan sayımların ortalamasıdır.



Şekil 30:  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenmiş Jelatin Mikrokürelerinin Organlardaki Dağılımı.



Şekil 31 :  $^{99m}\text{Tc}$ -Jelatin Mikrokürelerinin Organlardaki Dağılımı

- : Akciğerler
- : Karaciğer
- △ : Böbrekler
- : Kalp
- : Dalak



#### IV. TARTIŞMA

##### IV.1. Streptomisin Sülfat'ın Stabilitesi

Streptomisin sülfat'ın tanınması amacıyla literatürde verilen ince tabaka kromatografisi çalışmalarında maddenin sürüklenmediği bildirilmiştir<sup>143,178</sup>. Bu durum, araştırmamızda iki farklı çözücü sistemi kullanılarak da kanıtlanmış ancak parçalanma ürünlerini ayırmak amacıyla bu sistemler kullanıldığında olumlu sonuç alınamamıştır. Streptomisin sülfat, asid veya alkali hidrolizle parçalandığından<sup>146,147,149</sup>,<sup>150</sup> çalışmamızda madde, 0,5 N  $H_2SO_4$  ile hidroliz edilmiş ve Sugano ve ark.<sup>170</sup> tarafından geliştirilen kağıt kromatografisi yöntemi uygulanarak parçalanma ürününün Rf değeri (0.65) saptanmıştır. Streptomisin sülfat'ın pH 7 ve biraz üzerinde dayanıklı olduğu<sup>161</sup> kağıt kromatografisi çalışmalarımızda pH 7.4 izotonik fosfat tamponundaki streptomisin sülfat çözeltilerinin Rf değerlerinde değişiklik olmaması ile kanıtlanmıştır. Hazırlanan streptomisin sülfat çözeltileri oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 ay, 37°C de 3 saat bekletildikten sonra ince tabaka kromatografisine uygulandığında yeni bir leke görülmemiştir.

Mikrokürelerden etken maddenin salıverilme deneylerinin 37°C de yürütülmesi nedeniyle stabilite çalışmalarımızda bu sıcaklık uygulanmıştır.

Streptomisin sülfat'ın stabilitesini mikrokürelerden in vitro salıverilmesi sırasında da incelemek amacıyla salı-

verilme ortamı olarak kullanılan ve içinde mikrokürelerin bulunduğu 37°C lik pH 7.4 izotonik fosfat tamponundan 3 saat boyunca örnekler alınıp, kağıt kromatografisi ile incelendiğinde Rf değerlerinde herhangi bir değişiklik ve parçalanma ürününe ait bir leke saptanamadığından salıverilme ortamı olarak pH 7.4 izotonik fosfat tamponu kullanılmasına karar verilmiştir.

#### IV.2. Streptomisin Sülfat'ın Miktar Tayini

Streptomisin sülfat için literatürde kayıtlı olan miktar tayini çalışmalarının çoğu kolorimetrik yöntemler olup<sup>151,152,153,154,155,156,157,158</sup> az sayıda spektrofotometrik miktar tayin çalışması da bulunmaktadır<sup>151,159</sup>.

Çalışmamızda kullanılan, Wahbi ve ark.<sup>159</sup> tarafından verilen spektrofotometrik miktar tayin yöntemi, sulu ortam yerine pH 7.4 izotonik fosfat tamponu kullanılarak modifiye edilmiştir. Bu yöntemin esası, streptomisin sülfat'ın kaynar su banyosunda 2 saat asitle hidroliz edilerek parçalandıktan sonra spektrofotometrik olarak tayin edilmesine dayanmaktadır. Mikrokürelerin etken madde miktarının tayin edilebilmesinde bu yöntemin seçilmesinin nedeni, 2 saat gibi uzun bir süre asid ile kaynatma işlemi uygulandığından matriks maddesi olarak kullanılan albumin ve jelatinin erimesine, dolayısıyla da streptomisin sülfatın tümünün salıverilmesine olanak sağlanmasıdır. Koagüle proteinlerin ve jelatinin<sup>173</sup> kuvvetli inorganik asidlerle eridikleri bildirilmiştir.

Streptomisin sülfat, yukarıda anlatılan asid hidroliz uygulandıktan sonra pH 7.4 izotonik fosfat tamponunda literatüre uygun olarak<sup>159</sup> 320 ve 242 nm dalga boyunda maksimum absorbands göstermiştir (Şekil 12). Streptomisin sülfat taşıyan albumin ve jelatin mikrokürelerinde miktar tayini çalışmalarını yapacağımız dalga boyunu seçebilmek amacıyla bu mikrokürelere asid hidroliz işlemi uygulandıktan sonra spektrumları alındığında sadece 320 nm de maksimum absorbands saptanmıştır (Şekil 13,14). Streptomisin sülfatın 320 nm de gösterdiği bu maksimum absorbandsı matriks maddelerinin etkileyip etkilemediğini incelemek amacıyla yapılan çalışmada absorbandslar arasındaki fark (şekil 15,16) önemli bulunduğundan (p<0.05) (Tablo 8), miktar tayini çalışmalarında boş albumin ve jelatin mikrokürelerini içeren çözeltinin kör olarak kullanılmasına karar verilmiştir.<sup>172</sup> Böylece matriks maddelerinin neden olduğu çok düşük absorpsiyon farkı da ortadan kaldırılmıştır.

#### IV.3. Mikrokürelerin Hazırlanması ve Özellikleri

Streptomisin sülfat barsaktan absorplanmadığından i.m. yolla kullanılmakta fakat enjeksiyon yerinde ağrı ve irritasyon oluşabilmektedir<sup>13,14</sup>. Özellikle sekizinci sinir üzerinde yan etkiye sahiptir<sup>15</sup>. İntravenöz verildiğinde ise çok kısa sürede karaciğerde toplanıp, organizmayı terketmektedir<sup>183</sup>. Tüberküloz tedavisinde etkin olan bu maddenin mikrokürelerini hazırlayıp, akciğerlerde toplanmasını sağladığımızda yukarıda sözünü ettiğimiz sorunların önemli ölçüde ortadan kalkacağı

görüşünde olduğumuzdan, araştırmamızda etken madde olarak streptomisin sülfat kullanılmıştır.

Toksisitelerinin düşük<sup>17,30</sup> ve biyolojik olarak parçalanabilir<sup>30,57</sup> olmaları nedeniyle albumin ve jelatin çalışmalarımızda mikroküre hazırlamak için matriks maddeleri olarak seçilmiştir. Dolaşımında doğal olarak bulunması, partikül büyüklüğünün kolay kontrol altına alınabilmesi<sup>19,32</sup> şimdiye kadar rutin teşhis amacıyla kullanılmaması de<sup>101,125,127,128</sup> çalışmamızda albuminin tercih edilme nedeni olmuştur. Jelatinin ise hem albumin gibi endojen kaynaklı protein yapısında bir madde olması<sup>184</sup>, hem mikroküre/yağ emülsiyonu, hem de mikroküre şeklinde ilaç dağıtımını amacıyla kullanıldığında iyi sonuçlar alınmış olması<sup>5,6,30,93</sup>, çalışmamızda albuminin yanında alternatif bir matriks maddesi olarak kullanmaya yöneltmiştir.

Streptomisin sülfat suda çözünen, organik çözücülerde çözünmeyen bir madde olduğundan<sup>141.142.143</sup> çalışmamızda hazırlama yöntemi olarak emülsiyon polimerizasyon yöntemi uygulanmıştır. Matriks maddesi olarak seçilen albumin ve jelatinin suda çözünen, organik çözücülerde çözünmeyen maddeler olması<sup>184</sup> da emülsiyon polimerizasyonu yönteminin uygulanmasına olanak sağlamaktadır. Böylelikle etken madde ile matriks maddelerinin sulu çözeltisi hazırlanabilmekte ve su/yağ emülsiyonu oluşturulduktan sonra organik çözücü ilavesiyle matriks polimerize edilebilmektedir<sup>19,23</sup>.

Mikrokürelerin hazırlanmasında emülsifikasyon işleminin

büyük bir önemi olduğu görülmüştür. Çünkü oluşturulan emülsiyonun damlacık büyüklüğü ayarlanarak istenen büyüklükte mikroküre elde edilebildiği, çalışmamızda yapılan ön deneyler sonucu görülmüştür. Yaptığımız ön deneylerde ayrıca hazırlama sırasında karıştırma hızı artırıldıkça veya karıştırma zamanı uzatıldıkça mikroküre çapının küçüldüğü de gözlenmiştir<sup>60</sup>.

Sadece albumin mikrokürelerinin hazırlanması sırasında emülsifikasyon amacıyla el homojenizatörünün kullanılmasının nedeni, hazırlama işleminin oda sıcaklığında yürütülmesidir. Çünkü kullandığımız el homojenizatörü herhangi bir ısıtıcı sisteme sahip olmadığından ancak oda sıcaklığında çalışmaya uygundur. Oysa jelatin çözeltisi hazırlayabilmek için 40°C sıcaklık gerektiğinden ve dolayısıyla emülsifikasyon sırasında da bu sıcaklığın sabit tutulması mikrokürelerin küresel ve istenen büyüklükte elde edilebilmesi yönünden gerekli olduğundan el homojenizatörü kullanılamamıştır. Bu şekilde hazırlanan jelatin mikroküreleri geniş bir partikül dağılımı gösterdiğinden 45 µm elek açıklığının altında kalan mikroküreler deneylerde kullanılmıştır.

Hazırlanan jelatin mikrokürelerinin, albumin mikrokürelerine oranla daha büyük partiküllü olmalarının nedeni, hazırlama işlemi 40°C de yürütüldüğünden yağın viskozitesinin 25°C dekine göre azalması, jelatin ve su fazı miktarının yağ fazına oranla yüksek olması ayrıca emülsifikasyon işleminin homojenizatör kullanılmaksızın sadece mekanik karıştırıcı ile yürütülmesi olabileceği düşünülmektedir<sup>60,185</sup>.

Mikrokürelerin hazırlanması sırasında yüksek ısı uygulanarak<sup>19,23,49</sup> veya karbonil bileşikleri kullanılarak<sup>23,30,40</sup> matriks stabilize edilebilmektedir. Streptomisin sülfat'ın kimyasal yapısı yüksek ısı uygulanmasına elverişli olmadığından<sup>145,161</sup> araştırmamızda stabilizasyon, karbonil bileşik-leri kullanılarak yapılmıştır.

Mikrokürelerin hazırlama verimlerini saptamak amacıyla yaptığımız çalışmalarda, albumin mikroküreleriyle elde edilen verimin (% 38,6) jelatin mikroküreleriyle elde edilene (% 78,7) oranla düşük olduğu görülmüştür (Tablo 12). Mikrokürelerin hazırlanması sırasında matriks maddesi ve etken madde içeren başlangıç çözeltilerinin miktarları albumin mikroküreleri için 0.5 ml, jelatin mikroküreleri için 10 ml.'dir. Albumin mikrokürelerini hazırlarken el homojenizatöründen geçirerek emülsiyon oluşturma işlemi sırasında muhtemelen bir miktar kayıp olmakta ve zaten 0.5 ml gibi az miktardaki bir başlangıç çözeltisinden hareket edildiğinden, verimin jelatin mikrokürelere oranla daha düşük bulunmasına yol açmaktadır. Buna karşılık jelatin mikroküreleri hazırlanırken homojenizatörden geçirme işlemi olmadığından ayrıca, matriks maddesi ve etken maddeyi içeren başlangıç çözeltisi 10 ml gibi yüksek miktarda olduğundan fazla bir kayıp olmamaktadır.

#### IV.4. Streptomisin Sülfat'ın Mikrokürelere İn Vitro Salıverilmesi

Hazırlanan mikrokürelere etken madde hem mikroküre

içinde hapsedilmiş hem de yüzeyde adsorbe edilmiş olarak bulunmaktadır<sup>69,95</sup>. Hazırlama sırasında etken maddenin mikroküre yüzeyine yapışması nedeniyle salıverilmenin birinci fazını oluşturan patlama etkisi görülmektedir<sup>57,60</sup>. Çalışmamızda yapılan salıverilme deneylerinde de patlama etkisi belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Patlama etkisinin çoğunlukla 5 dakika içinde tamamlandığı bildirilmiştir<sup>23,38</sup>. Salıverilme profillerinden de görüldüğü gibi (Şekil 24) patlama etkisi nedeniyle mikrokürelerden etken maddenin büyük bir kısmı birkaç dakika içinde salıverilmektedir. Widder ve ark.<sup>23</sup>'ün yaptığı çalışmada da albumin mikrokürelerinden etken maddenin ilk 5 dakika içinde salıverildiği, ancak in vivo sonuçların buna göre farklılık gösterebileceği görülmüştür. Araştırmamızda, jelatin mikrokürelerinde görülen patlama etkisinin, albumin mikrokürelerine oranla çok daha ani ve fazla olduğu ayrıca, 1 saat sonunda salıverilen etken madde miktarının albumin mikrokürelerinde % 80.01 iken jelatin mikrokürelerinde % 95.93'e ulaştığı saptanmıştır. Albumin mikrokürelerini stabilize etmek için kullanılan 2.3-butandion jelatin mikrokürelerini stabilize etmek için kullanıldığında in vivo deneyler sırasında yeterli stabilizasyon sağlanamadığı gözlemlendiğinden formaldehid gibi farklı bir karbonil bileşiğinin kullanılması ve stabilizasyonun derecesi açısından bu maddelerin konsantrasyonlarının da önemli olması nedeniyle etken maddenin salıverilmesinde farklılıklar görülmesi beklenebilir. Çünkü mikrokürelerden etken maddenin difüzyonla salıverilmesinde stabilizasyon derecesinin hız kısıtlayıcı bir basamak olduğu ve çapraz

bağlayıcı madde konsantrasyonu arttırıldıkça salıverilmenin yavaşladığı gösterilmiştir<sup>60,64</sup>.

Salıverilmenin ikinci fazında mikrokürelerin şişmesi, etken maddenin çözünmesi ve matriksin dışına difüzyonu söz konusu olduğundan çalışmamızda patlama etkisinin görüldüğü ilk faza oranla daha yavaş bir salıverilme izlenmiştir. Bu bulgu Tomlinson ve ark.<sup>60</sup>, Brophy ve ark.<sup>38</sup> ile Widder ve ark.<sup>23</sup> tarafından yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir. Ayrıca, mikrokürelerden etken maddenin difüzyonla salıverilmesinde hız kısıtlayıcı bir basamak olan matriksin çapraz bağlanma derecesi de bu şekilde bir salıverilme meydana gelmesinde etken olabilir<sup>60,64</sup>. Çünkü çapraz bağlayıcı madde konsantrasyonu arttırıldıkça<sup>60,64</sup> ve çapraz bağlama süresi uzatıldıkça<sup>23</sup> salıverilmenin yavaşladığı gösterilmiştir.

Intravenöz olarak verilen bir maddenin organizmada herhangi bir hedef organa gidebilmesi için gerekli olan süre yaklaşık 5 dakika olarak belirtilmektedir<sup>23</sup>. Bizim çalışmamızda akciğerlere hedeflendirme sözkonusudur ve verilen mikrokürelerin öncelikle gidecekleri organlar kalp ve akciğerler olduğundan yukarıda belirtilenden daha kısa bir sürede hedef organa ulaşacakları düşünülebilir. Aslında i.v. enjeksiyondan sonra patlama etkisiyle salıverilen etken maddenin de venöz dolaşım yoluyla akciğerlerden geçeceği açıktır.

Çalışmamızda albumin ve jelatin mikrokürelerinin her ikisinde de kısa sürede oluştuğu izlenen patlama etkisiyle



Önemli sayılabilecek miktarda streptomisin sülfat salıverildiği gözlenmiştir. 3. dakikada salıverilen streptomisin sülfat miktarı albumin mikrokürelerinde % 32.72, jelatin mikrokürelerinde % 57.34 olarak bulunmuştur (Şekil 24, Tablo 13). Widder ve ark.<sup>23</sup> tarafından yapılan çalışmada da albumin mikrokürelerinden ilk 5 dakikada salıverilen etken madde miktarının % 40 olduğu gösterilmiştir. Tomlinson ve ark.<sup>60</sup> mikrokürelerin etken madde içeriğinin yüksek düzeylere çıkarıldığında salıverilmenin hızlandığını ancak hala iki fazlı salıverilmenin korunduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da salıverilme hızlı olmasına rağmen iki fazlı salıverilmenin devam ettiği görülmektedir (Şekil 24). Salıverilmenin ilk fazında görülen patlama etkisinin ardından ikinci fazdaki salıverilmenin 1 saat boyunca devam ettiği belirlenmiştir. O halde yukarıda anlatılanların ışığı altında, mikrokürelerden etken madde salıverilmesini yavaşlatmak için, çapraz bağlayıcı madde konsantrasyonunun arttırılması, çapraz bağlama süresinin uzatılması ve mikrokürelerin etken madde içeriğinin azaltılması gibi değişiklikler yapılabilir.

#### IV.5. Mikrokürelerin Organizmadaki Dağılımlarının In Vivo İncelenmesi

Araştırmamızda albumin ve jelatin mikrokürelerinin yanısıra serbest streptomisin sülfat'da <sup>99m</sup>Tc ile işaretlenmiştir. <sup>99m</sup>Tc.'un yarılanma ömrünün 6 saat gibi kısa olması<sup>103</sup> bu madde ile çalışılırken uzun süreli radyasyon alma riskini azaltmaktadır. Ayrıca bir geçiş elementi olması

nedeniyle moleküllere kompleks oluşturarak oldukça kararlı bir şekilde bağlanmaktadır<sup>103</sup>. Çalışmamızda <sup>99m</sup>Tc ile işaretleme yapılırken, literatürde mevcut olan demir ve kalay ile indirgeme yöntemlerinden <sup>103</sup> daha yüksek bir işaretleme yüzdesine ulaşılabildiği için demir ile indirgeme yöntemi kullanılmıştır<sup>19,103</sup>. Yaptığımız işaretleme kalite kontrolü sonucunda <sup>99m</sup>Tc'in hemen hemen tamamının albumine bağlandığı gösterilmiştir (Tablo 14).

Albumin ve jelatin mikroküreleri ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla işaretli serbest streptomisin sülfatın organlarda ilk 15 dakikadaki in vivo dağılımı incelendiğinde literatürde de gösterildiği şekilde<sup>183</sup>, % 42 gibi yüksek düzeylerde karaciğerde, %2.60 akciğerlerde, % 5.58 böbreklerde, % 0.181 kalpte ve % 3.40 dalakta toplandığı saptanmıştır (Şekil 27, Tablo 17). Serbest streptomisin sülfat karaciğerde toplandığından, amacımız ise streptomisin sülfat'ın akciğerlere hedeflendirilmesi olduğundan mikroküreleri hazırlanmış ve i.v. olarak uygulanmıştır.

Çalışmamızda mikrokürelerin hedef organ olan akciğerlerde toplanmasını sağlamak için pasif hedeflendirmeden yararlanılmıştır. Bu hedeflendirme şekli i.v. olarak verilen kolloidal partiküllerin vücudun doğal dağılım modelinden yararlanılarak istenen organa gönderilip, orada tutulmasının sağlanması esasına dayanmaktadır<sup>26,30,106</sup>. Bu amaçla yaptığımız çalışmada <sup>99m</sup>Tc ile işaretli 29 µm büyüklüğündeki albumin ve 31 µm büyüklüğündeki jelatin mikroküreleri i.v. olarak verildikten sonra organlardaki dağılımları saptanmıştır.

7-12  $\mu\text{m}$ 'den daha büyük partiküller, i.v. olarak verildiğinde kapiler blokaj nedeniyle akciğerler tarafından mekanik filtreye uğradıklarından pasif olarak akciğerlere hedeflendirilebilmektedir<sup>26,30</sup>. 10 dakikada albumin mikroküreleri akciğerlerde % 58.2, jelatin mikroküreleri ise % 41.3 düzeylerde saptanmış, 1, 4 ve 24. saatlerdeki düzeyler ise albumin mikroküreleri için sırasıyla % 46,3, % 29,2 ve % 9,46 iken, jelatin mikroküreleri için % 39,5, % 25,2 ve % 9,72 olarak bulunmuştur (Şekil 28,29,30,31, Tablo 18,19). Hem albumin hem de jelatin mikroküreleri 4 saat boyunca akciğerlerde oldukça yüksek düzeylerde kalmışlardır. Karaciğerde ise 10. dakikada albumin mikroküreleri % 11,1 düzeylerde iken, 1,4 ve 24. saatlerde sırasıyla % 14,1, % 14,3 ve % 22,2 gibi gittikçe artan düzeylerde saptanmış, bu da Sugibayashi ve ark.<sup>29</sup> nin çalışmasıyla uyum göstermiştir. Jelatin mikrokürelerinin 10. dakika ile 1, 4 ve 24. saatlerde karaciğerdeki düzeyleri de sırasıyla % 9.67, % 16.1, % 12.2 ve % 4.73 olarak saptanmıştır.

Hernekadar in vitro deney bulguları ile in vivo ekstrapolasyona gitmek kompleks kan dolaşımı farklılıkları ve salıverilme ortamının değişik olması nedeniyle mümkün değil ise de<sup>23</sup> in vivo deneyler, in vitro salıverilme deneyleri (Şekil 24) ile karşılaştırıldığında, mikrokürelerin akciğerlerde kalış süresinin uzun olduğu görülmektedir.

Belirgin olan bu farklılığın nedeninin tartışılmasında in vitro salıverilme deneyleri ile in vivo dağılım deneylerinin incelenmesi yararlı olacaktır. In vitro salıverilme

deneylerinde etken maddenin salıverilen miktarlarının saptanmasına karşılık in vivo dağılım deneylerinde  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretli taşıyıcının akciğerlerdeki aktivitesi ölçülerek tutulan mikroküre miktarı saptanmaktadır. Radyoaktif olarak matriks işaretlendiğinden etken madde daha kısa süre de salıverilse de taşıyıcı akciğerlerde bir süre daha kalabilmektedir. İşte bu nedenle 4. ve 24. saatte dahi akciğerlerde albümin mikroküreler için sırasıyla % 29.2 ve % 9.46 jelatin mikroküreleri için sırasıyla % 25.2 ve % 9.72 olmak üzere hala radyoaktivite saptanabilmektedir (Tablo 18,19).

In vivo bulgular çalışmamızın amacı olan streptomisin sülfat mikrokürelerinin akciğerlere hedeflendirilip, çoğunlukla akciğerlerde toplanmasını sağlayabildiğimizi; günümüzde farmasötik araştırmanın en başta gelen amaçlarından biri olan hedef doku ve organa ilaç taşınmasına ulaşabildiğimizi göstermektedir. Çapraz bağ yapıcı madde konsantrasyonunun ve süresinin değiştirilmesiyle mikrokürelerde yapılacak değişiklikler ile akciğerlerdeki patolojik incelemelerin, araştırmamızın ilerideki aşamalarında bize yardımcı olacağı kanısındayız.

## ÖZET

Bu araştırmanın amacı, streptomisin sülfat mikroküreleri hazırlamak, in vitro salıverilmeyi incelemek ve i.v. verildiğinde doğrudan doğruya akciğerlerde toplanmasını sağlayarak daha düşük dozda etken madde ile hem toksisiteyi düşürmek, hem de yüksek etki elde etmek ve böylece bu preparat şekli ile, ülkemizde büyük bir önemi olan, tüberküloz hastalığının tedavisine daha akılcı bir yaklaşım getirmektir.

Aminoglikozid grubu bir antibiyotik olan streptomisin sülfat'ın kimyasal ve fizikokimyasal özellikleri kontrol edilmiştir. Streptomisin sülfat'ın in vitro salıverilme deneyleri sırasında stabilitesi kağıt kromatografisi ile çalışılmış, pH 7.4 izotonik fosfat tamponunda 37°C lik su banyosunda parçalanma ürünü görülmemiştir.

Matriks maddeleri olarak albumin ve jelatin kullanılmış ve emülsiyon polimerizasyonu yöntemine göre streptomisin sülfat'ın mikroküreleri hazırlanmıştır. Hazırlanan mikroküreler, 2,3-butandion ve formaldehid kullanılarak stabilize edilmiştir.

Mikrokürelerden streptomisin sülfat'ın salıverilmesi incelenmiş, ilk 5 dakika içinde patlama etkisi nedeniyle gözlenen hızlı salıverilmeyi, matriksden difüzyon yoluyla daha yavaş bir salıverilmenin izlediği görülmüştür.

Streptomisin sülfat'ın in vivo dağılımının incelenmesi

amacıyla  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretli serbest streptomisin sülfat ve yaklaşık 30  $\mu\text{m}$  büyüklükteki mikroküreler farelerin kuyruk venasından enjekte edilmiş; 10,60 dakika ile 4 ve 24 saat sonra fareler öldürülerek akciğerler, karaciğer, dalak, böbrekler ve kalpteki radyoaktivite karşılaştırılmıştır. Tüm hayvan deneylerinde, serbest streptomisin sülfat'ın karaciğerde mikrokürelerin ise akciğerlerde diğer organlara göre daha yüksek düzeyde toplandığı gözlenmiştir.

## SUMMARY

The aim in this study is to formulate microspheres of a tuberculostatic agent, streptomycin sulphate, for intravenous administration, and to accumulate them in the lungs, to reduce toxicity and increase efficiency by using lower dose of the active substance.

The chemical and physicochemical properties of streptomycin sulphate, an aminoglycoside type of antibiotic, is investigated. The stability of streptomycin sulphate during in vitro release studies is controlled by paper chromatography. No degradation product in pH 7.4 isotonic phosphate buffer at 37°C is observed.

Streptomycin sulphate microspheres are prepared by emulsion polymerization method using albumin and gelatin as matrix materials. The microspheres are stabilized by 2,3-butanedione and formaldehyde.

When in vitro release of streptomycin sulphate from microspheres are investigated, due to burst effect in the first 5 minutes and slow release due to diffusion from matrix material are observed.

To determine the distribution within the body,  $^{99m}\text{Tc}$  labeled free streptomycin sulphate and approximately 30  $\mu\text{m}$  sized microspheres are injected into the tail veins of mice. The mice are sacrificed after 10 min, 60 min, 4 h and 24 h.

The radioactivity of the lungs liver, spleen, kidneys and heart is compared. In all the animal experiments the accumulation of free streptomycin sulphate in the liver and the accumulation of microspheres in the lungs exceeded the percentage in other organs.



## K A Y N A K L A R

1. Hashida, M., Sezaki, H., Specific delivery of mitomycin C: Combined use of prodrugs and spherical delivery systems, *Microspheres and Drug Therapy 'de*, Eds. Davis, S.S Illum, L., McVie, J.G, Tomlinson, E., Amsterdam, 1984.
2. Pourkavoos, N., Hodges, N.A., Ollif, C.J., Newall, C., Sharratt, P., The protection of  $\beta$ -lactam antibiotics from enzymic inactivation by entrapment within liposomes, 2<sup>nd</sup> Eur.Cong. Biopharm. Pharmacokin.Proc., Salamanca, 1984.
3. Zimmermann, U., Cellular drug-carrier systems and their possible targeting, *Targeted Drugs'da*, Ed. Goldberg, E.P., New York, 1983.
4. Ihler, G.M., Glew, R.H., Schnure, F.W., Enzyme loading of erythrocytes, *Proc.Natl. Acad.Sci, USA*, 70 (9), 2663-2666 (1973).
5. Hashida, M., Yashioka, T., Muranishi, S., Sezaki, H., Dosage form characteristics of microsphere-in-oil emulsions. I.Stability and drug release, *Chem. Pharm. Bull.*, 28(4), 1009-1015(1980).
6. Hashida, M., Takahashi, Y., Muranishi, S., Sezaki, H., An application of water-in-oil and gelatin-microsphere-in-oil emulsions to specific delivery of anticancer agent into stomach lymphatics, *J.Pharmacokin.Biopharm.*, 5(3), 241-255 (1977) ,

7. Uno, K., Arakawa, M., Kondo, T., Donbrow, M., Permeability of ethylcellulose microcapsules towards phenobarbital, *J. Microencapsulation*, 1(4), 335-341 (1984).
8. Kante, B., Couvreur, P., Dubois-Krack, G., De Meester, C., Guiot, P., Roland, M., Mercier, M., Speiser, P., Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles I: Free nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, 71(7), 786-792 (1982).
9. Couvreur, P., Kante, B., Grislain, L., Roland, M., Speiser, P., Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, 71(7), 790-792 (1982).
10. Tomlinson, E., Burger, J.J., Incorporation of water-soluble drugs in albumin microspheres, *Methods in Enzymology*'de Eds., Widder, K.J., Green, R., New York, 1985.
11. Deluca, P., Kanke, M., Bivins, B., Slack, J., Simmons, G., Yokel, R., Schroeder, H., Sniecinski, I., The fate and effects of Ce 141 labeled microspheres following i.v. or i.a. administration in beagle dogs., 2<sup>nd</sup> Int. Conf. Pharm. Tech., Paris, 1980.
12. Braude, A.I., Antimicrobial drug therapy, Cilt 8, Saunders Company, Philadelphia, 1976.
13. Martindale The Extra Pharmacopoeia, 28. Baski, The Pharmaceutical Press, London, 1982.
14. Garrod, L.P., Antibiotic and Chemotherapy, 4. Baski, Churchill Livingstone, London, 1973.

15. Kaymakçalan, Ş., Kayaalp, S.O., Kıran, B.K., (çev.),  
Tıbbi Farmakoloji, Prensipler ve Kavramlar, 3.Baskı,  
Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1976.
16. Gregoriadis, G., Targeting of drugs, Nature, 265,407-411  
(1977).
17. Scheffel, U., Rhodes, B.A., Natarajan, T.K., Wagner, H.  
N.Jr., Albumin microspheres for study of the reticulo-  
endothelial system, J.Nucl. Med., 13, 498-503 (1972).
18. Rhodes, B.A., Stern, H.S., Buchanan, J.A., Zolle, I.,  
Wagner, H.N.Jr., Lung scanning with <sup>99m</sup>Tc-microspheres,  
Nucl. Med., 99, 613-621 (1971).
19. Rhodes, B.A., Zolle, I., Buchanan, J.W., Wagner, H.N.Jr.,  
Radioactive albumin microspheres for studies of the  
pulmonary circulation, Nucl. Med., 92, 1453-1460(1969).
20. Bernard, N.G., Shaw, S.M., Kessler, W.V., Landolt, R.R.,  
Peck, G.E., Distribution and degradation of iodine-  
125 albumin microspheres and technetium- 99m sulfur  
colloid, Can.J.Pharm. Sci., 15(2), 30-34(1980).
21. Zolle, I., Rhodes, B.A., Wagner, H.N., Jr., Preparation of  
metabolizable radioactive human serum albumin microsphere  
for studies of the circulation, Int. J.Appl. Rad.Isot.,  
21, 155-167(1970).
22. Kaplan, M.R., Calef, E., Bercovici, T., Gitler, C., The  
selective detection of cell surface determinants by means  
of antibodies and acetylated avidin attached to highly  
flourescent polymer microspheres, Biochim. Biophys. Acta,  
728, 112-120, (1983).

23. Widder, K., Flouret, G., Senyei, A., Magnetic microspheres: Synthesis of a novel paranteral drug carrier, *J.Pharm. Sci.*, 68(1), 79-82(1979).
24. Widder, K.J., Senyei, A.E., Ovadia, H., Paterson, P.Y., Magnetic protein A microspheres: a rapid method for cell separation, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 14, 395-400 (1979).
25. Widder, K.J., Senyei, A.E., Scarpelli, D.G., Magnetic microspheres: A model system for site specific drug delivery in vivo, *Proc.Soc. Exp.Biol.Med.*, 58,141-146 (1978).
26. Tomlinson, E., Microsphere delivery systems for drug targeting and controlled release, *Int.J.Pharm. Tech. Prod.Mfr.*, 4(3),49-57(1983).
27. Tice, T.R., Cowsar, D.R., Biodegradable controlled-release paranteral systems, *Pharm. Tech.*, 8,26-35(1984).
28. Burger, J.J., Tomlinson, E., Mcvie, J.G, Microparticles intended for microvasculature blockage. Drug incorporation and release, *Drug Targeting '84*, Eds.Buri, P., Gumma, A., 1985.
29. Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Nadai, T., Kato, Y., Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. I. Tissue distribution of microsphere-entrapped 5-fluorouracil in mice, *Chem.Pharm.Bull.*, 25(12), 3433-3434 (1977).

30. Yoshioka, T., Hashida, M., Muranishi, S., Sezaki, H.,  
Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen  
and lung: nano-and microspherical carriers of gelatin,  
Int.J.Pharm., 81, 131-134(1981).
31. Illum, L., Davis, S.S., Wilson, C.G., Thomas, N.W., Frier,  
M., Hardy, J.G., Blood clearance and organ deposition  
of intravenously administered colloidal particles. The  
effects of particle size, nature and shape, Int. J.  
Pharm., 12,135-146(1982).
32. Russell, G.F.J., Starch microspheres as drug delivery  
systems, Pharm. Int., 4(10),260-262(1983).
33. Illum, L., Davis, S.S., Effect of the nonionic surfactant  
poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene  
microspheres following intravenous administration, J.  
Pharm. Sci., 72(9), 1086-1089(1983).
34. Widder, K.J., Marino, P.A., Morris, R.M., Senyei, A.E.,  
Targeting antineoplastic agents using magnetic albumin  
microspheres, Targeted Drugs'da, Ed. Goldberg, E.P.,  
New York, 1983.
35. Edman, P., Ekman, B., Sjöholm, I., Immobilization of  
proteins in microspheres of biodegradable polyacryldextran,  
J.Pharm. Sci., 69(7), 838-842(1980)
36. Wakiyama, N., Juni, K., Nakano, M., Preparation and  
evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid mic-  
rospheres containing dibucaine, Chem.Pharm.Bull.,  
30(10).3719-3727 (1982).

37. Slack, J.D., Kanke, M., Simmons, G.H., DeLuca, P.P.,  
Acute hemodynamic effects and blood pool kinetics of  
polystyrene microspheres following intravenous administ-  
ration, *J.Pharm.Sci.*, 70(6), 660-664 (1981).
38. Brophy, M.R., Deasy, P.B., Egg albumin microspheres  
containing sulphamethizole, *J.Microencapsulation*, 1(2),  
157-168 (1984).
39. Sjöholm, I., Edman, P., Acrylic microspheres in vivo. I.  
Distribution and elimination of polyacrylamide micro-  
particles after intravenous and intraperitoneal injection  
in mouse and rat, *J.Pharmacol. Exp.Ther.*, 211(3),  
656-660 (1979).
40. Longo, W.E., Iwata, H., Lindheimer, T.A., Goldberg, E.P.,  
Preparation of hydrophilic albumin microspheres using  
polymeric dispersing agents, *J.Pharm. Sci.*, 71(12), 1323-  
1328 (1982).
41. Edman, P., Sjöholm, I., Acrylic microspheres in vivo. II.  
The effect in rat of L-asparaginase given in micropar-  
ticles of polyacrylamide, *J.Pharmacol. Exp. Ther.*,  
211(3), 663-667 (1979).
42. Ishizaka, T., Endo, K., Koishi, M., Preparation of egg  
albumin microcapsules and microspheres, *J.Pharm. Sci.*,  
70(4), 358-363 (1981).
43. Edman, P., Sjöholm, I., Acrylic microspheres in vivo VIII.  
Distribution and elimination of polyacryldextran partic-  
les in mice, *J.Pharm.Sci.*, 72(7), 796-799 (1983).

44. Edman, P., Sjöholm, I., Acrylic microspheres in vivo V. Immunological properties of immobilized asparaginase in microparticles, *J.Pharm. Sci.*, 71(5), 576-580 (1982).
45. Edman, P., Sjöholm, I., Acrylic microspheres in vivo VI: Antitumor effect of microparticles with immobilized L-asparaginase against 6C3HED lymphoma, *J.Pharm.Sci.*, 72(6), 654-658 (1983).
46. Edman, P., Sjöholm, I., Brunk, U., Acrylic microspheres in vivo VII: Morphological studies on mice and cultured macrophages, *J.Pharm. Sci.*, 72(6), 658-665 (1983).
47. Mosbach, K., Schröder, Preparation and application of magnetic polymers for targeting of drugs, *FEBS Lett.*, 102(1), 112-116 (1979).
48. Senyei, A.E., Widder, K.J., Drug targeting: magnetically responsive albumin microspheres a review of the system to date, *Gynecol. Oncol.*, 12, 1-13 (1981).
49. Senyei, A.E., Reich, S.D., Gonczy, C., Widder, K.J., In vivo kinetics of magnetically targeted low-dose doxorubicin, *J.Pharm. Sci.*, 70(4), 389-391 (1981).
50. Widder, K.J., Senyei, A.E., Ranney, D.F., In vitro release of biologically active adriamycin by magnetically responsive albumin microspheres, *Cancer Res.*, 40, 3512-3517 (1980).

51. Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Nadai, T., Kato, Y., Hasegawa, A., Arita, T., Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy II. Preparation and tissue distribution in mice of microsphere-entrapped 5-fluorouracil, *Chem. Pharm. Bull.*, 27(1), 204-209 (1979).
52. Widder, K.J., Senyei, A.E., Ovadia, H., Paterson, P.Y., Specific cell binding using staphylococcal protein A magnetic microspheres, *J. Pharm. Sci.*, 70(4), 387-389 (1981).
53. Widder, K.J., Morris, R.M., Poore, G., Howard, D.P. Jr., Senyei, A.E., Tumor remission in Yoshida sarcoma-bearing rats by selective targeting of magnetic albumin microspheres containing doxorubicin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Med. Sci.*, 78(1), 579-581 (1981).
54. Widder, K.J., Morris, R.M., Poore, G.A., Howard, D.P., Senyei, A.E., Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: total remission in Yoshida Sarcoma-bearing rats, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 19(1), 135-139 (1983).
55. Kramer, P.A., Burnstein, T., Phagocytosis of microspheres containing an anticancer agent by tumor cells in vitro, *Life Sci.*, 19, 515-520 (1976).
56. Fujimoto, S., Endoh, F., Okui, K.K., Morimoto, Y., Sugibayashi, K., Miyakawa, A., Suzuki, H., Continued in vitro and in vivo release of an antitumor drug from albumin microspheres, *Experientia*, 39, 913-916 (1983).



57. Lee, T.K., Sokoloski, T.D., Royer, G.P., Serum albumin beads: an injectable, biodegradable system for the sustained release of drugs, *Science*, 213, 233-235 (1981).
58. Widder, K.J., Senyei, A.E., Magnetic albumin microspheres in drug delivery, *Microspheres and Drug Therapy*'de Eds. Davis, S.S., Illum, L., McVie, J.G., Tomlinson, E., Amsterdam, 1984.
59. Schröder, U., Ståhl, A., Salford, L.G., Crystallized carbohydrate spheres for slow release, drug targeting and cell separation, *Microspheres and Drug Therapy*'de Eds. Davis, S.S., Illum, L., McVie, J.G. Tomlinson, E., Amsterdam, 1984.
60. Tomlinson, E., Burger, J.J., Schoonderwoerd, E.M.A., McVie, J.G., Human serum albumin microspheres for intraarterial drug targeting of cytostatic compounds. Pharmaceutical aspects and release characteristics, *Microspheres and Drug Therapy*'de, Eds. Davis, S.S., Illum, L., McVie, J.G., Tomlinson, E., Amsterdam, 1984.
61. Bissery, M.C., Valeriote, F., Thies, C., In vitro and in vivo evaluation of CCNU-loaded microspheres prepared from poly( $\pm$ )-lactide) and Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate), *Microspheres and Drug Therapy*'de, Eds. Davis, S.S., Illum, L., McVie, J.G., Tomlinson, G., Amsterdam, 1984.
62. Sugibayashi, K., Akimoto, M., Morimoto, Y., Nadai, T., Kato, Y., Drug-carrier property of albumin microspheres in chemotherapy III. Effect of microsphere-entrapped 5-fluorouracil on Ehrlich Ascites Carcinoma in mice, *J. Pharm. Dyn.* 2, 350-355 (1979).

63. Aronsen, K.F., Hellekant, C., Holmberg, J., Rothman, U., Teder, H., Controlled blocking of hepatic artery flow with enzymatically degradable microspheres combined with oncolytic drugs, *Eur.Surg.Res.*, 11, 99-106 (1979).
64. Baker, R.W., Tuttle, M.E., Helwing, R., Novel erodible polymers for the delivery of macromolecules, *Pharm.Tech.*, 8(2), 26-30 (1984).
65. Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., Speiser, P., Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties, *J.Pharm.Pharmacol.*, 31, 331-332 (1979).
66. Brasseur, F., Couvreur, P., Kante, B., Deckers-Passau, L., Roland, M., Deckers, C., Speiser, P., Actinomycin D adsorbed on polymethylcyanoacrylate Nanoparticles: increased efficiency against an experimental tumor, *Europ.J. Cancer*, 16, 1441-1445 (1980).
67. Counsell, R.E., Pohland, R.C., Lipoproteins as potential site-specific delivery systems for diagnostic and therapeutic agents, *J.Med.Chem.*, 25(10), 1115-1120 (1982).
68. Rhodes, B.A., Wagner, H.N.Jr., Improved Lung scans using  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin microspheres, *J.Nucl.Med.*, 10(6), 432 (1969).
69. Kramer, P.A., Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery, *J.Pharm.Sci.*, 63(10), 1646-1647 (1974).

70. Paulssen, M.M.P., Van Pelt, B.C., Oral treatment of haemophilia a by factor VIII bound to chylomicra, *The Lancet*, 13, 1310 (1981).
71. Gal, D., Macdonald, P.C., Porter, J.C., Simpson, E.R., Cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. III. Low-density Lipoprotein metabolism, *Int.J.Cancer*, 28, 315-319 (1981).
72. Florence, A.T., Spheres of activity, *Pharm.J.*, 229, 291-298 (1982).
73. Munford, R.S., Andersen, J.M., Dietschy, J.M., Sites of tissue binding and uptake in vivo of bacterial Lipopolysaccharide-high density lipoprotein complexes, *J.Clin. Inv.*, 68, 1503-1513 (1981).
74. Ibrahim, A., Couvreur, P., Roland, M., Speiser, P., New magnetic drug carrier, *J.Pharm.Pharmacol.*, 35, 59-61 (1983).
75. Rambourg, P., Lévy, J., Lévy, M.-C., Microencapsulation III: Preparation of invertase microcapsules, *J.Pharm.Sci*, 71(7), 753-758 (1982).
76. El-Samaly, Rohdewald, P., Polyacrilamide microbeads, a sustained release drug delivery system, *Int.J.Pharm.*, 23-24 (1983).
77. Wakiyama, N., Juni, K., Nakano, M., Preparation and evaluation in vitro of polylactic acid microspheres containing local anesthetics, *Chem.Pharm. Bull.*, 29(11), 3363-3368 (1981).

78. Wise, D.L., McCormick, G.J., Willet, G.P., Anderson, L.C., Sustained release of an antimalarial drug using a copolymer of glycolic/lactic acid, *Life Sci.*, 19, 867-874 (1976).
79. Kumakura, M., Suzuki, M., Adachi, S., Kaetsu, I., Polyacrolein microspheres as immunoreagents, *J. Immunol. Methods*, 63, 115-122 (1983).
80. Kumakura, M., Kaetsu, I., Polymeric microspheres for immunoresearch, *Immunol., Comm.*, 13(2), 119-125 (1984).
81. Margel, S., A novel approach for heavy metal poisoning treatment, a model, mercury poisoning by means of chelating microspheres: hemoperfusion and oral administration, *J. Med. Chem.*, 24, 1263-1266 (1981).
82. Lévy, M.C., Rambourg, P., Lévy, J., Potron, G., Microencapsulation IV: Cross-linked hemoglobin microcapsules, *J. Pharm. Sci.*, 71(7), 759-762 (1982).
83. Sieg, J.W., Triplett, J.W., Precorneal retention of topically instilled micronized particles, *J. Pharm. Sci.*, 69(7), 863-864 (1980).
84. Kojima, T., Hashida, M., Muranishi, S., Sezaki, H., Antitumor activity of timed-release derivative of mitomycin C, agarose bead conjugate, *Chem. Pharm. Bull.*, 26(6), 1818-1824 (1978).
85. Arfors, K.E., Forsberg, J.O., Larsson, B., Lewis, D.H., Rosengren, B., Ödman, S., Temporary intestinal hypoxia induced by degradable microspheres, *Nature*, 262, 500-501 (1976).

86. Lindell, B., Aronsen, K.F., Nosslin, B., Rothman, U., Studies in pharmacokinetics and tolerance of substances temporarily retained in the liver by microsphere embolization, *Ann. Surg.*, 187(1), 95-99 (1978).
87. Tuma, R.F., Forsberg, J.O., Agerup, B., Enhanced uptake of actinomycin D in the dog kidney by simultaneous injection of degradable starch microspheres into the renal artery *Cancer*, 50, 1-5 (1982).
88. Gyves, J.W., Ensminger, W.D., Van Harken, D., Niederhuber, J., Stetson, P., Walker, S., Improved regional selectivity of hepatic arterial mitomycin by starch microspheres, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 34(2), 259-265 (1983)
89. Artursson, P., Edman, P., Laakso, T., Sjöholm, I., Characterization of polyacryl starch microparticles as carriers for proteins and drugs, *J. Pharm. Sci.*, 73(11), 1507-1513 (1984)
90. Schacht, E., Goethals, E., Gyselinck, P., Thienpont, D., polymer drug combinations VI. Sustained release of levamisole from ion exchange resins, *J. Pharm. Belg.*, 37 (3), 183-188 (1982).
91. Kato, T., Nemoto, R., Mori, H., Takahashi, M., Tamakawa, Y., Harada, M., Arterial chemoembolization with microencapsulated anticancer drug, *JAMA*, 245 (11), 1123-1127 (1981).
92. Illum, L., Davis, S.S., Cellulose microspheres as a sustained release system for paranteral administration, *Int.*

J. Pharm., 11, 323-327 (1982).

93. Hashida, M., Muranishi, S., Sezaki, H., Tanigawa, N., Sato-  
mura, K., Hikasa, Y., Increased lymphatic delivery of  
bleomycin by microsphere in oil emulsion and its effect  
on lymph node metastasis, Int. J. Pharm., 2, 245-256  
(1979).
94. Morimata, Y., Akimoto, M., Sugibayashi, K., Nadai, T., Ka-  
to, Y., Drug-carrier property of albumin microspheres  
in chemotherapy. IV. Antitumor effect of single-shot  
or multiple-shot administration of microsphere-entrap-  
ped 5-fluorouracil on Ehrlich Ascites or solid tumor  
in mice, Chem. Pharm. Bull., 28 (10), 3087-3092  
(1980).
95. Martodam, R.R., Twumasi, D.Y., Liener, I.E., Powers, J.C.,  
Nishino, N., Krejcarek, G., Albumin microspheres as  
carrier of an inhibitor of leukocyte elastase: potential  
therapeutic agent for emphysema, Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA, Biochem, 76(5), 2128-2132 (1979).
96. Ariel, I.M., Padula, G., Treatment of symptomatic metasta-  
tic cancer to the liver from primary colon and rectal  
cancer by the intraarterial administration of chemot-  
herapy and radioactive isotopes, J.Surg. Oncol., 10,  
327-336 (1978).

97. Senyei, A., Widder, K., Czerlinski, G., Magnetic guidance of drug-carrying microspheres, *J. Appl. Phys.*, 49 (6) 3578-3583 (1978).
98. Widder, K.J., Marino, P.A., Morris, R.M., Howard, D.P., Poore, G.A., Senjei, A.E., Selective targeting of magnetic albumin microspheres to the Yoshida sarcoma: ultrastructural evaluation of microsphere disposition, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 19 (1), 141-147 (1983).
99. Ovadia, H., Paterson, P.Y., Hale, J.R., Magnetic microspheres as drug carriers: Factors influencing localization at different anatomical sites in rats, *Isr. J. Med. Sci.*, 19, 631-637 (1983).
100. Burdine, J.A., Ryder, L.A., Sonnemaker, R.E., DePuey, G., Calderon, M.,  $^{99m}\text{Tc}$ -Human albumin microspheres for lung imaging, *J. Nucl. Med.*, 12(3), 127-130 (1970).
101. Raban, P., Gregora, V., Sindelar, J., Alvarez-Cervera, J., Two alternate techniques of labeling iron-free albumin microspheres with  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{113m}\text{In}$ , *J. Nucl. Med.*, 14 (6), 344-345 (1973).
102. Kanke, M., Simmons, G.H., Weiss, D.L., Bivins, B.A., Deluca, P.P., Clearance of  $^{141}\text{Ce}$ -labeled microspheres from blood and distribution in specific organs following intravenous and intraarterial administration in beagle dogs, *J. Pharm. Sci.*, 69 (7), 755-762 (1980).

103. Ercan, M., Chromatographic quality control of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled radiopharmaceuticals, Hacettepe Bulletin of Medicine/Surgery, 9 (3-4), 85-90 (1976).
104. Subramanian, G., McAfee, J.G., A new complex of  $^{99m}\text{Tc}$  for skeletal imaging, Radiology, 99, 192-196 (1971).
105. Tomlinson, E., McVie, J.G., New directions in cancer chemotherapy 2. Targeting with microspheres, Pharm. Int., 4(11), 281-284 (1983).
106. Illum, L., Davis, S.S., The kinetics of uptake and organ deposition of colloidal drug carrier particles delivered to rabbits, Second European Congress of Biopharmaceutics and pharmacokinetics, Proceedings-Vol. II, Experimental Pharmacokinetics, Salamanca, FIP, (1984).
107. Guyton, A.C., Textbook of Medical Physiology, 9. Baski, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1976.
108. Blanchard, R.J.W., Grotenhuis, I., LaFave, J.W., Perry, J.F., Blood supply to hepatic V2 carcinoma implants as measured by radioactive microspheres, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118, 465-468 (1965).
109. Lindell, B., Aronsen, K.F., Rothman, U., Sjögren, H.O., The circulation in liver tissue and experimental Liver metastases before and after embolization of the liver artery, Res. Exp. Med., 171, 63-70 (1977).



110. Madoule, Ph., Trampont, Ph., Roche, A., Chemoembolization: principles and perspectives, *J. Microencapsulation*, 1(1), 21-25 (1984).
111. Puisieux, F., Raziell, A., Microspheres pour embolisation, *Sci. Techn. Pharm.* 11 (4), 149-156 (1982).
112. Benoit, J.P., Microcapsules et microspheres pour chimio-embolisation, *Chimicaoggi*, March, 49-54 (1985).
113. Driscoll, C.F., Morris, R.M., Senyei, A.E., Widder, K.J., Heller, G.S., Magnetic targeting of microspheres in blood flow, *Microvasc. Res.*, 27, 353-369 (1984).
114. Cohen, D., Ferromagnetic contamination in the lungs and other organs of the human body, *Science*, 180, 745-748 (1973).
115. Tritton, T.R., Yee, G., The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells, *Science*, 217, 248-250 (1982).
116. Illum, L., Davis, S.S., The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338), *FEBS Lett.*, 167, 79-83 (1984).
117. Hashida, M., Muranishi, S., Sezaki, H., Evaluation of water in oil and microsphere in oil emulsions as a specific delivery system of 5-fluorouracil into lymphatics, *Chem. Pharm. Bull.*, 25 (9), 2410-2418 (1977).

118. Morimoto, Y., Sugibayashi, K., Kato, Y., Drug-Carrier property of albumin microspheres in chemotherapy. V. Anti-tumor effect of microsphere-entrapped adriamycin on liver metastasis of AH 7974 cells in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, 29 (5) 1433-1438 (1981).
119. Fukushima, S., Juni, K., Nakane M., Preparation of and drug release from W/O/W type double emulsions containing anticancer agents, *Chem. Pharm. Bull.*, 31 (11) 4048-4056 (1983).
120. Davis, S.S., Recent advances in biopharmaceutics-Drug delivery systems, 2<sup>nd</sup> Eur. Cong. Biopharm. Pharmacokin. Proc. Volume I, Salamanca, 1984.
121. Amsel, L.P., Hinsvark, O.N., Rotenberg, K., Sheumaker, J.L., Recent advances in sustained-release technology using ion-exchange polymers, *Pharm. Tech.*, 8(2). 28-48 (1984).
122. Benoit, J.P., Benita, S., Puisieux, F., Thies. C., Stability and release kinetics of drugs incorporated within microspheres, *Microspheres and Drug Therapy*'de Eds. Davis, S.S., Illum, L., McVie, J.G., Tomlinson, E., Amsterdam, 1984.
123. Taplin, G.V., Johnson, D.E., Dore, E.K., Kaplan, H.S., Suspensions of radioalbumin aggregates for photoscanning the liver, spleen, lung and other organs, *J. Nucl. Med.*, 5, 259-275 (1964).

124. Littenberg, R.L., Anaphylactoid reaction to human albumin microspheres, *J.Nucl. Med.*, 16 (3), 236-237 (1974).
125. Davis, M.A., Taube, R.A., Pulmonary perfusion imaging: Acute toxicity and safety factors as a function of particle size, *J.Nucl. Med.*, 19 (11), 1206-1213 (1978).
126. Sjöholm, I., Edman, P., The use of biocompatible micro-particles as carriers of enzymes and drugs in vivo, *Microspheres and Drug Therapy*'de Eds. Davis, S.S., Illum, L., McVie, J.G., Tomlinson, E., Amsterdam, 1984.
127. Bostrom, S., Brown, D.W., Spherodized albumin (human) microspheres and lung imaging, *J.Nucl. Med.*, 12(6), 474(1971)
128. Verdon, T.A. Jr., Anger, H.O., Yano, Y., Dyke, D.V.,  $^{99m}\text{Tc}$ -spherodized albumin (human) microspheres for lung imaging, *J.Nucl. Med.*, 12 (6), 469-470 (1971).
129. Gelman, S., Use of microspheres for gut blood flow determination, *Surgery*, 89 (5), 526 (1981).
130. Kato, T., Encapsulated drugs in targeted cancer therapy, CRC, *Controlled Drug Delivery*'de, 2. Cilt. Ed. Bruck, S.D. Florida, 1983.
131. Oppenheim, R.C., Solid Colloidal drug delivery systems: nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 8, 217-234 (1981).
132. Knop, G., Münze, R., Altenbrunn, H.J. A preparation of tin-albumin nanospheres for labelling with  $^{99m}\text{Tc}$  and application in liver scintigraphy, *J. Microencapsulation*, 1(3), 249-252 (1984).

133. Zolle, I., Rhodes, B.A., Buchanan, J.W., Wagner, H.N.Jr., Properties and uses of radioactive albumin microspheres, *J.Nucl. Med.*, 9 (6), 363 (1968).
134. Zolle, I., Hosain, F., Rhodes, B.A., Wagner, H.N. Jr., Human serum albumin millimicrospheres for studies of the reticuloendothelial system, *J.Nucl.Med.*, 11 (6), 379 (1970).
135. Rateliffe, J.H., Hunneyball, I.M., Wilson, C.G., Smith, A., Davis, S.S., Microsphere systems for intraarticular drug administration, *Microsphere and Drug Therapy*'de, Eds. Davis, S.S., Illum, L., McVie, J.G., Tomlinson, E., Amsterdam, 1984.
136. Madden, R.E., Paparo, A., Schwartz, M., Limiting Vascular diameters in various organs as determined by microspheres, *Arch. Surg.* 96(1), 130-137 (1968).
137. Madoule, Ph., Trampont, Ph., Doyon, D., Quillard, J., Puisieux, F., Experimentation chez le chien de micro-billes utilisables en angiographie thérapeutique, *J.Radiol.*, 62 (8-9). 457-462 (1981).
138. Madoulé, Ph., Trampont, Ph., Quillard, J., Doyon, D., Laval-Jeantet, M., Zouai, O., Tilleul, P., *Sci, Tech. pharm.*, 11(10), 441-445 (1982).

139. Waksman, S.A., Schatz, A., Streptomycin-orişin, nature, and properties, J.Am.Pharm. Assoc., 34 (11), 273-291 (1945).
140. Waksman, S.A., Streptomycin: Background, isolation, properties, and utilization, Antibiot. Chemother., 3 (4), 333-346 (1953).
141. Türk Farmakopesi 1974 (T.F. 1974), Milli Eğitim Basımevi, İstanbul, 1974.
142. HUSA, S Pharmaceutical Dispensing, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1959.
143. Clarke, E.G.C., Isolation and identification of drugs, The Pharmaceutical Press, London 1969.
144. Glasby, J.S., Encyclopaedia of Antibiotics, 2. Baskı, John Willey and Sons, New York, 1979.
145. The Dispensatory of the United States of America, 25. Baskı J.B.Lippincott Company, Philadelphia, 1960.
146. Brink, N.G., Kuehl, F.A., Folkers, K., Streptomyces antibiotics, III. Degradation of Streptomycin to streptobiosamine derivatives, Science 102, 506-507 (1945).
147. Lemieux, R.U., Wolfrom, M.L., The chemistry of streptomycin, Advances in Carbohydrate Chemistry'de, 3. Cilt, Eds. Pigman, W.W., Wolfrom, M.L., Academic Press, New York, 1948.

148. Regna, P.P., Wasselle, L.A., Solomons, I.A., The stability of streptomycin, *J.Biol. Chem.*, 165, 631-638 (1946).
149. Cooper, D.J., Comparative chemistry of some aminoglycoside antibiotics, IUPAC, Symposium on Antibiotic 'de, Ed. Rakhit, S., Canada 1971.
150. Carter, H.E., Clark, R.K.Jr, Dickman, S.R., Loo, Y.H., Meek, J.S., Skell, P.S., Strong, W.A., Degradation of streptomycin and the structure of streptidine and streptomine, *Science*, 103, 53-54 (1946).
151. Garrat, D.C., *The Quantitative Analysis of Drugs*, 3. Baski, Charles C Thomas, Springfield, 1964.
152. Monastero, F., A colorimetric determination of streptomycin and dihydrostreptomycin, *J.Am. Pharm. Assoc.*, 41(6), 322-324 (1952).
153. Vivina, O., Angeles, O., Determination of streptomycin and of dihydrostreptomycin in pharmaceutical preparations, *Bol. Soc. Quim. Peru.*, 21, 189-211 (1955). C.A. 50, 8970 b (1956)
154. Duda, E., A new, sensitive method for the determination of streptomycin, *Anal. Biochem.*, 51, 651-653 (1973).
155. Duda, E., Marton, L., Kiss, G., Modifications of the thio-barbituric acid assay of streptomycin, *Biochem. Med.*, 15, 330-332 (1976).

156. Szafir, J.J., Bennett, E.O., The adaptation of the Voges-Proskauer reaction for the quantitative assay of streptomycin, *Science*, 117, 717-718 (1953).
157. Benerjee, H.K., Chemical assay of antibiotics. a. Colorimetric determination of streptomycin, dihydrostreptomycin, their mixtures, and derivatives in medicinal Preparations. *Ind. Pharm.*, 10, 301-308 (1955). C.A.50, 6746 h (1956).
158. Darilari, E.M., Ocaranza, E., Navarro, A.T., Photocolorimetric determination of streptomycin with Reinecke salt. *Publ. Inst. Invest. Microquim., Univ. Natl. Litoral*, 25, 10-15 (1959-1960). C.A.57, 7388 1 (1962).
159. Wahbi, A.M., Abdine, H., Sadek, A.R.H., The spectrophotometric determination of streptomycins, *Pharmazie*, 32 (H.11), 690-692 (1977).
160. *British Pharmacopoeia, 1973 (B.P. 1973)*, University of Printing House, Cambridge, 1973.
161. Woodard, W.A., Recent developments in the pharmacy of antibiotics, *The Pharmacy of Antibiotics*'de.
162. Buckwalter, F.H., Antibiotic Formulations, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 15(11). 694-700 (1954).
163. Seneca, H., *Biological Basis of Chemotherapy of Infections and Infestations*. F.A. Davis, Philadelphia, 1971.
164. Pratt. W.B., *Fundamentals of Chemotherapy*, Oxford University Press, London, 1973.

165. Hussar, A.E., Holley, H.L., Antibiotics and Antibiotic Therapy, The Macmillan Co., New York, 1954.
166. Valentine F.C.O., Shooter, R.A., Recent Advances in Chemotherapy, 3. Cilt, J. and A. Churchill Ltd., London, 1954.
167. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Baskı, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980.
168. Code of Federal Regulations, 21, 436.105, 1984.
169. Stahl, E., Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook Springer-Verlag, Berlin, 1969.
170. Yoshinori, S., Tadashi, W., Studies on the coloration of streptomycin. Part III. On the paper chromatography of streptobiosamine and streptidine, Nippon Nogeikagaku Kaishi., 37, 743-746 (1963). I.P.A.2, 482 c (1965).
171. Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography, E. Merck, Darmstadt, 1976.
172. Sümblüoğlu, K., Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik, Çağ Matbaası, Ankara, 1978.
173. İzgü, E., Doğanay, T., Jelatin süksinat kullanılarak koaservasyonla mikrokapsülleme koşullarının ve bu mikrokapsüllerden sülfizoksazolun çıkış hızının incelenmesi, Ank. Ecz. Fak. Mec., 6, 54-87 (1976).
174. Tanaka, N., Takino, S., Utsumi, I., A new oral gelatinized sustained-release dosage form, J. Pharm. Sci., 52(7), 664-667 (1963).
175. Martin, A.N., Swarbrick, J., Cammarata, A., Physical Pharmacy, Lea and Febiger, Philadelphia, 1973.



176. Billinghamurst, M.W., Chromatographic quality control of  $^{99m}\text{Tc}$ -Labeled compounds, *J.Nucl.Med.*, 14(11), 793-797 (1973).
177. CRC Atlas of Spectral Data and Physical Constants for Organic Compounds, Cilt 6, CRC Press, Ohio, 1975.
178. Dalkara, S., Tüberkülostatik ilaçların yan yana kalitatif analizleri üzerinde çalışmalar, (Doktora Tezi), H.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi (1978).
179. List, P.H., Arzneiformenlehre, 2.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1980.
180. Hess, H.Schatz, B., Hilfsstoffe für Arzneiformen, Herausgegeben von Sucker, H., Fuchs, P., Speiser, P., Georg. Thieme Verlag, Stuttgart, 1978.
181. Güven, K.C., Sel, İ., İlaç Endüstrisi Teknolojisi, Volüm III-V, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, 1981.
182. Shotton, E., Ridgway, K., Physical Pharmaceutics, Clarendon Press, Oxford, 1974.
183. Nelson, W.E., Forgacs, J., Kucera, J.L., Alteration of the distribution and excretion of streptomycin, *Proc.S.Exp. Biol.Med.*, 64, 20-21(1947).
184. The Merck Index, 9.Baskı, Merck and Co., Inc., Rahway, N.J., 1976.
185. Takamura, A., Ishii, F., Noro, S., Koishi, M., Effect of homogenization conditions on the physicochemical properties of emulsion bases, *Chem.Pharm. Bull.*, 31(8), 2786-2792 (1983).

Ankara'da doğdum. İlk ve Ortaokul ile Liseyi 'Ankara'-  
da bitirdim. 1975 yılında Ankara Üniversitesi Eczacılık  
Fakültesine girdim, 1980 yılında mezun oldum. 1982 yılında  
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Tekno-  
loji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak göreve baş-  
ladım. Halen bu görevimi sürdürmekteyim.