

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS
(MRSA) KAYNAKLI DERİ ENFEKSİYONLARIN
TEDAVİSİ İÇİN TOPİKAL BİYOADEZİF JEL
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Ecz. Ece TÜRKMEN

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS
(MRSA) KAYNAKLI DERİ ENFEKSİYONLARIN TEDAVİSİ
İÇİN TOPIKAL BİYOADEZİF JEL FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ**

Ecz. Ece TÜRKMEN

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sevda ŞENEL**

ANKARA

2024

**METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA)
KAYNAKLI DERİ ENFEKSİYONLARIN TEDAVİSİ İÇİN TOPIKAL
BİYOADEZİF JEL FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Ecz. Ece TÜRKMEN

Danışman: Prof. Dr. Sevda ŞENEL

Bu tez çalışması 9.10.2024 tarihinde jürimiz tarafından
"Farmasötik Teknoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Selma Şahin*
(Hacettepe Üniversitesi)
- Üye:** *Prof. Dr. Ali Osman Kılıç*
(Karadeniz Teknik Üniversitesi)
- Üye:** *Prof. Dr. F. Figen Tırnaksız*
(Gazi Üniversitesi)
- Üye:** *Prof. Dr. F. Nevin Çelebi*
(Başkent Üniversitesi)
- Üye:** *Doç. Dr. Nazlı Erdoğan*
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

10. Ekim 2024

Prof. Dr. ~~NAĞME~~ YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

9/10/2024

Ece TÜRKMEN

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metodların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

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

Ecz. Ece TÜRKMEN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim boyunca çalışmalarımda desteğini ve güvenini her zaman gösteren ve hissettiren, bilimsel olarak bana yol gösteren, akademik bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan saygıdeğer ve değerli danışman hocam Prof. Dr. Sevda ŞENEL'e,

Doktora eğitimime başlama kararımда yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. İmran VURAL'a, Doktora eğitimim boyunca Anabilim Dalı Başkanlığı görevi yürüten ve çalışmalarımда her türlü imkânı sağlayan Prof. Dr. Levent ÖNER ve Prof. Dr. Erem BİLENSOY hocalarım olmak üzere tüm değerli öğretim üyesi hocalarıma, araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, Tezim boyunca bilimsel yönlendirmeleri ve destekleri için Tez İzleme Komite üyesi hocalarım Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ ve Prof. Dr. F. Figen TIRNAKSIZ'a, Tez çalışmalarımın yürütülmesinde bilgi ve tecrübeleriyle destek olan Prof. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU, Doç. Dr. Ceren ÖZKUL KOÇAK ve Doç. Dr. Hande CANPINAR'a, In vivo çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Aykut ÖZKUL ve çalışma ekibinden Alireza HANIFEHNEZHAD'a, Doktora eğitimim boyunca çalışmalarımда bana yardımcı olan ve manevi desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Selin PARMAKSIZ'a, Tez çalışmalarımın yürütülmesinde desteği olan Başkent Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. A. Ahmet BAŞARAN ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. F. Nevin ÇELEBİ ve asistan arkadaşlarıma, doktora eğitimimde her zaman yanımda olmuş, desteklerini hiçbir zaman esirgememiş olan canım babam Mehmet TÜRKMEN ve canım annem Raziye TÜRKMEN'e ve desteklerini ve sevgilerini hissettiğim canım ablalarım,

2211- C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Bursu Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığına (BİDEB), Tez çalışmalarım için Katılımlı Araştırma Projesi (TUK-2022-19958) desteği sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

ÖZET

Türkmen, E., Metisiline Dirençli Staphylococcus Aureus (MRSA) Kaynaklı Deri Enfeksiyonların Tedavisi İçin Topikal Biyoadezif Jel Formülasyonlarının Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Bu çalışmada *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)’un antibiyotiklere dirençle birlikte son on yılda toplumda sıklıkla görülen enfeksiyonlara neden olan Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)’unun derideki enfeksiyonlarının tedavisinde topikal yolla uygulanacak özellikle antimikrobiyal dirence karşı etkisi artırılmış ve “Tek Sağlık” kapsamında enfeksiyonun birbirleri arasında taşınmasını engelleyecek şekilde beşeri ve veteriner alanda kullanılacak bir ilaç sisteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Antimikrobiyal dirençle (AMR) mücadelede enfeksiyonlarının tedavisi için geliştirilen alternatifler arasında antibiyotikler dışında antimikrobiyal aktiviteye sahip başka ilaçlar (fajlar, faj endolizini vb.) ve antibiyotiklerin etkisini artıran farklı formülasyon tasarımları bulunmaktadır. Bu tezde antimikrobiyal etkisi bilinen fusidik asit ve sodyum tuzu (sodyum fusidat) için etkinliğini artıracak şekilde bir formülasyon geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bununla birlikte antibiyotiğe alternatif olarak sentezlenen bir faj endolizini (LysSA10) ve antibiyotik+endolizin kombinasyonu içeren kendisinin de antimikrobiyal özellikleri olan biyoadezif biyopolimer olan kitosan kullanılarak jel formülasyonları geliştirilmiştir. Formülasyonların karakterizasyonunun ardından in vitro olarak ilaç salımı, biyogeçimlilik ve antibakteriyel aktivite incelenmiştir. En uygun formülasyonlar ile in vivo çalışmalara geçilerek farelerdeki MRSA ilişkili deri enfeksiyonu modelinde etkileri piyasa ürünleriyle karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonunda topikal uygulama için biyoyumlu, MRSA suşlarına karşı antibakteriyel aktivitenin artırıldığı ve kolay uygulanabilen, etki bölgesinde uzun süre kalarak sürekli ilaç salımı sağlayan daha etkili bir ilaç sistemi geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Kitosan, MRSA, endolizin, fusidik asit, topikal ilaç taşıyıcı sistem

Destekleyen Kurum: Katılımlı Araştırma Projesi - Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TUK- 2022-19958)

ABSTRACT

Türkmen, E., Development of Topical Bioadhesive Gel Formulations for the Treatment of Skin Infections Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA), Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Pharmaceutical Technology Programme, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2024. In this study, it was aimed to develop a drug delivery system that will be applied topically in the treatment of skin infections caused by Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), which has caused frequent infections in the community in the last decade together with resistance to antibiotics of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), and will be used in human and veterinary fields in a way that will increase its effect especially against antimicrobial resistance and prevent the transmission of infection between each other within the scope of "One Health". There are other antimicrobials (phages, phage endolysins, etc.) and different formulation designs that increase the effect of antibiotics for the treatment of infections in the fight against antimicrobial resistance (AMR). In this thesis, it was aimed to develop a formulation for local application that will increase the effect of fusidic acid and its sodium salt (sodium fusidate), which have antimicrobial effects. In addition, gel formulations have been developed using chitosan, a bioadhesive biopolymer with antimicrobial properties, which contains a phage endolysin (LysSA10) synthesized as an alternative to antibiotics, along with a combination of antibiotic and endolysin. After characterization of the formulations, in vitro drug release, biocompatibility and antibacterial activity were examined. In vivo studies were conducted with the most suitable formulations and their effects were compared with commercial products in the MRSA-associated skin infection model in mice. As a result, a more effective, biocompatible drug system for topical application was developed, characterized by increased antibacterial activity against MRSA strains, ease of application, and sustained drug release in the target area.

Keywords: Chitosan, MRSA, endolysin, fusidic acid, topical drug delivery system

Supported by: Hacettepe Scientific Research Coordination Unit, Project number:
TUK-2022-19958

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLOLAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Derinin Özellikleri	4
2.1.1. Deriden Geçiş Yolları	5
2.1.2. Yara İyileşmesi	7
2.2. Antimikrobiyal Direnç (AMR) ve Tedavi Stratejileri	10
2.3. MRSA Kaynaklı Deri Enfeksiyonu	11
2.4. MRSA Kaynaklı Deri Enfeksiyonu Tedavisi	13
2.4.1. Sistemik Tedavi	14
2.4.2. Topikal Tedavi	15
2.5. Deri Enfeksiyonlarının Tedavisinde Uygulanan Topikal Dozaj Şekilleri	17
2.6. Fusidik Asit ve Sodyum Fusidat	18
2.7. Endolizin (LysSA10)	20
2.8. Kitosan	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	26
3.2. Kullanılan Cihazlar	28
3.3. Etkin Maddelere Ait Çalışmalar	29
3.3.1. Fusidik Asit Miktar Tayini ve Validasyonu	30
3.3.2. Sodyum Fusidat Miktar Tayini ve Validasyonu	34
3.3.3. Endolizin Miktar Tayini ve Validasyonu	35

3.4. Formülasyon Geliştirme	35
3.4.1. Jel Formülasyonlarının Hazırlanması	35
3.5. Formülasyonların Karakterizasyonu	39
3.5.1. pH	39
3.5.2. Yüzey Özellikleri	39
3.5.3. Viskozite	39
3.5.4. In Vitro Adezyon Çalışmaları	40
3.5.5. Şırınga Edilebilirlik	41
3.6. Formülasyonlar Üzerinde İn Vitro Çalışmalar	42
3.6.1. In Vitro Salım Çalışmaları	42
3.6.2. Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları	43
3.6.3. Hücre Canlılığı Çalışmaları	45
3.6.4. Stabilite Çalışmaları	46
3.7. In Vivo Çalışmalar	46
3.7.1. Ön Çalışmalar	46
3.7.2. Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi	52
3.8. İstatistiksel Analizler	56
4. BULGULAR	57
4.1. Fusidik Asit ve Sodyum Fusidat Miktar Tayini ve Validasyonu	57
4.2. Endolizin (LysSA10) Miktar Tayini ve Validasyonu	65
4.3. Formülasyon Geliştirme ve Karakterizasyon	66
4.3.1. pH	67
4.3.2. Yüzey Özellikleri	69
4.3.3. Viskozite	70
4.4. İn Vitro Çalışmalar	75
4.4.1. Adezyon	75
4.4.2. Şırınga Edilebilirlik	75
4.4.3. In Vitro Salım Çalışmaları	75
4.4.4. Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları	82
4.4.5. Stabilite	89
4.4.6. Hücre Canlılığı Çalışmaları	90
4.4.7. Geliştirilen Formülasyonların Özelliklerinin Karşılaştırılması	92
4.5. In Vivo Çalışmalar	96
4.5.1. Ön Çalışmalar	96

4.5.2. Formülasyonlarla Yapılan Çalışmalar	105
4.5.3. Formülasyonlara Ait İn Vivo Sonuçların Karşılaştırılması	131
5. TARTIŞMA	134
5.1. Jel Formülasyonlarının Geliştirilmesi	136
5.2. Formülasyonların İn Vitro Değerlendirilmesi	140
5.2.1. İlaç Salımı	140
5.2.2. Antibakteriyel Aktivite	141
5.2.3. Hücre Canlılığı	146
5.3. İn Vivo Çalışmalar	147
5.3.1. Fusidik Asit İçeren Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi	148
5.3.2. Sodyum Fusidat İçeren Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi	151
5.3.3. Endolizin İçeren Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi	154
5.3.4. Endolizin + Fusidik Asit İçeren Jel Formülasyonların İn Vivo Değerlendirmesi	155
5.3.5. Endolizin+Sodyum Fusidat İçeren Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi	156
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	157
7. KAYNAKLAR	158
8. EKLER	183
EK-1 : ETİK KURUL KARARI	183
EK-2 : DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI	185
EK-3 : YAYIN BİLGİSİ	186
EK-4 : TEZ ÇALIŞMASI ORIJINALLIK RAPORU	187
EK-5 : DIJİTAL MAKBUZ	188
9. ÖZGEÇMİŞ	189

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMR	Antimikrobiyal direnç
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
BCA	Bikinkonik asit
CFU	Colony forming unit
DST	Dünya Sağlık Teşkilatı
FA	Fusidik asit
FAO	Gıda ve Tarım Organizasyonu
FBS	Fötal Bovin Serum
ICH	Uluslararası Uyum Konseyi
IL	İnterlökin
LB	Luria Bertani Besiyeri
Lys	Faj endolizini
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyonu
MPO	Miyeloperoksidaz aktivitesi
MRSA	Metisilin rezistan <i>Staphylococcus aureus</i>
MSA	Mannitol salt agar
MWCO	Molecular Weight Cut Off
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
PBS	Phosphate Buffer Saline
SDS- PAGE	Sodyum Dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SF	Sodyum fusidat
TNFα	Tümör nekroz faktör α
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy broth

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Derinin yapısı (41).	4
2.2. İlaçların deriden geçiş yolları.	6
2.3. Yara iyileşme evreleri (62).	8
2.4. Fusidik asit (a) ve sodyum fusidatın (b) kimyasal yapısı.	19
2.5. Kitin ve kitosanın yapısı.	23
3.1. TA-XT Plus model tekstür analiz cihazı.	40
3.2. Tekstür analiz cihazında bulunan biyoadezyon ölçümü için kullanılan aparatlar a) yük hücresi, b) çıkarılabilir alüminyum prob, c) mukoadazyon rigi.	41
3.3. Tekstür analiz cihazında şırınga edilebilirlik ölçümü düzeneği.	41
3.4. Lezyon boyutunun ölçümü (beyaz çizgi uzunluğu: U; kırmızı çizgi genişliği:G).	48
3.5. Enfekte dokuda bakteriyel yük tayinine ait örnek. Hayvanlardan alınan doku örnekleri 10^{-1} 'den 10^{-6} 'ya kadar seri dilüsyonları ve mannitol salt agara ekimi sonucunda dilüsyona bağlı üremenin azaldığı görülmüştür.	50
3.6. In vivo çalışma protokolü.	54
4.1. Fusidik asidin HPLC kromatogramı (mobil faz içerisinde).	57
4.2. Sodyum fusidatın HPLC kromatogramı (mobil faz içerisinde).	58
4.3. Fusidik asidin (a) ve sodyum fusidatın (b) doğrusalılık çalışması sonucunda elde edilen kalibrasyon doğrusu (n=6) (mobil faz içerisinde).	59
4.4. Fusidik aside ait özgüllük sonuçları a) placebo çözeltisi, b) formülasyon (25 µg/mL), c) standart çözelti (25 µg/mL), d) mobil faz.	62
4.5. Sodyum fusidata ait özgüllük sonuçları a) placebo çözeltisi, b) formülasyon (25 µg/mL), c) standart çözelti (25 µg/mL), d) mobil faz.	63
4.6. Geliştirilen jel formülasyonlarının makroskobik görünüşleri.	68
4.7. Boş, fusidik asit veya sodyum fusidat yüklü kitosan jeller ve ticari ürüne ait akış eğrileri (n=3).	72
4.8. Endolizin ve endolizin+fusidik asit ve endolizin sodyum fusidat içeren jellere ait akış eğrileri(n=3).	73
4.9. Fusidik asit(a) ve sodyum fusidata (b) ait salım profilleri (n=6).	76
4.10. Endolizin, endolizin + fusidik asit ve endolizin sodyum fusidat içeren jellere ait salım profilleri (n=3).	78
4.11. Kitosan jellere ait hücre canlılığı sonuçları.	90
4.12. Fusidik asit içeren kitosan jellere ait hücre canlılığı sonuçları.	91

4.13.	Sodyum fusidat içeren kitosan jellere ait hücre canlılığı sonuçları.	91
4.14.	Endolizin, endolizin ve fusidik asit kombinasyonu, endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren kitosan jellere ait hücre canlılığı sonuçları.	92
4.15.	Subkütan enjeksiyon.	96
4.16.	ATCC 43300 ve MRSA4 ile enfekte edilen ve kontrol grubuna ait görüntüler.	97
4.17.	Hayvan ağırlıkları (ön çalışmalar) (n=6).	97
4.18.	Enfeksiyon sonrası oluşan lezyonların alanları.	98
4.19.	Enfekte edildikten sonra 3.günde lezyonda canlı bakteri sayısı (CFU/mL).	99
4.20.	Serum fizyolojik ve enfekte gruplarda 3. gündeki deriye ait histolojik kesitler (hemotoksilen ve eozin boyaması) intakt doku (a); serum fizyolojik uygulanmış doku (b); ATCC 43300 ile enfekte edilmiş doku (c) ve MRSA4 ile enfekte edilmiş doku (d) apse oluşumu (►) indüklenmiş ve MRSA4 ile enfekte tüm doku örneklerinde ülserasyon (→). E: epidermis, D: dermis.	100
4.21.	Histopatolojik değerlendirmeler: (a) Akut enflamasyon skoru; (b) Kronik enflamasyon skoru; (c) Ülser Çapı; (d)Apse alanı.	102
4.22.	Kontrol ve enfekte edilen deri örneklerinde enfekte edildikten 3 gün sonraki MPO aktivitesi.	103
4.23.	Ön çalışmalarda 3. günde alınan deri örneklerindeki sitokin düzeyleri (3. gün).	105
4.24.	Deney süresince hayvan ağırlığındaki değişimin takibi.	106
4.25.	Kontrol ve enfekte gruplarda makroskopik görüntüler.	108
4.26.	Jel formülasyonları ve ticari ürün gruplarına ait makroskopik görüntüler.	109
4.27.	Kontrol ve enfekte olan gruplarda formülasyon uygulama öncesi (0-3.gün) ve sonrası (4-14.gün) sırt derisindeki lezyon alanları.	110
4.28.	Enfeksiyon sonrası 11. Gün (Gün 14) sonunda lezyonların histopatolojisi (a) negatif kontrol, (b) pozitif kontrol, (c) fusidik asit içeren ticari krem, (d) fusidik asit çözeltisi (FAsol), e) %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel (gK3), (f) %3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jel (gM3), (g) Fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3), (h) fusidik asit içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (FA + gM3), ı) intakt doku ülserasyon (ok →), ve apse oluşumu (ok ucu ►) E: Epidermis, D:Dermis.	112
4.29.	Histopatolojik değerlendirme, a) akut enflamasyon, b) kronik enflamasyon, c) apse alanı.	113
4.30.	Formülasyon uygulanan ve kontrol gruplarda derideki enfeksiyon sonrası 11. gün ait bakteriyel yük sonuçları. *FAsol grubu uygulanan hayvanlar enfeksiyon sonrası 6. gün sonunda sakrifiye edilmiştir.	114

- 4.31. Kontrol grubu ve formülasyon uygulanan deri örneklerinde 14.güne ait MPO aktivitesi. (*FAsol grubu uygulanan hayvanlar enfeksiyon sonrası 6. günün sonunda sakrifiye edilmiştir). 115
- 4.32. Deri örneklerindeki sitokin ekspresyonu (enfeksiyon sonrası 11. gün): a)TNF- α ve b)IL-6. 118
- 4.33. Deri örneklerindeki sitokin ekspresyonu (enfeksiyon sonrası 11. gün): a)IL17a ve b)IL1 β . 119
- 4.34. Enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda lezyonların histopatolojisi. (a) fizyolojik deri, (b) pozitif kontrol, (c) %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel (gK3), (d)%3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jel (gM3), (e) sodyum fusidat içeren ticari merhem, (f). sodyum fusidat çözeltisi (SFsol), (g) sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3), (h) sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3), (i) Endolizin çözeltisi (LysSA10), (i)Endolizin içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + gK3), (j) Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + FA + gK3), (k) Endolizin ve sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + SF + gK3) uygulanan grup ve (p) fizyolojik deri ülserasyon (ok →) ve apse oluşumu (ok ucu ►) E: Epidermis, D:Dermis. 121

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Fusidik asit miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemi koşulları.	31
3.2.	Sodyum fusidat miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemi koşulları.	34
3.3.	Kitosan özellikleri.	36
3.4.	Geliştirilen jel formülasyonları.	38
3.5.	Antibakteriyel aktivite çalışmalarında incelenen <i>Staphylococcus aureus</i> standart ve klinik izolatlar.	44
3.6.	Ön çalışma grupları.	48
3.7.	Histopatolojik skorlama.	51
3.8.	Çalışma grupları.	55
4.1.	Fusidik asidin ve Sodyum Fusidatın HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.	57
4.2.	Fusidik asidin ve sodyum fusidatın analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk sonuçları (n=6).	60
4.3.	Fusidik asidin ve sodyum fusidatın analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik sonuçları (n=6).	61
4.4.	Fusidik asidin ve sodyum fusidatın mobil faz içerisinde stabilitesine ilişkin bulgular (n=6).	64
4.5.	Fusidik asidin ve sodyum fusidatın salım ortamı içerisinde stabilitesine ait bulgular (n=6).	64
4.6.	Fusidik asidin ve sodyum fusidatın jellerden ekstraksiyon sonrası geri kazanıma ait sonuçlar (n=6).	65
4.7.	Endolizinin miktar tayini için yöntemlerin karşılaştırılması.	66
4.8.	Fusidik asit için farklı sürfaktanlarla yapılan çözünürlük çalışması sonuçları (n=3).	66
4.9.	Geliştirilen jel formülasyonlarının özellikleri.	74
4.10.	Jel formülasyonlarından etkin madde salımı.	79
4.11.	Salım çalışmasının 6. saati sonunda salınan ve membranda kalan etkin madde miktarları.	81
4.12.	İnertlik çalışması sonucu elde edilen % geri kazanım değerleri.	82
4.13.	Kontrol grupları ve formülasyonlara ait standart ve klinik izolatlarla karşı elde edilen MİK değerleri.	87

4.14.	Endolizin ve endolizin+fusidik asit/sodyum fusidat içeren jel formülasyonları ve piyasa preparatlarına ait standart ve klinik izolatlara karşı elde edilen MİK değerleri.	88
4.15.	Jel formülasyonlarına ait stabilite sonuçları.	89
4.16.	Jel formülasyonlarının ve fusidik asit içeren jellerin özelliklerinin karşılaştırılması.	94
4.17.	Sodyum fusidat içeren jel formülasyonlarının ve piyasa preparatlarının özelliklerinin karşılaştırılması.	95
4.18.	Enfeksiyon sonrası 3. güne ait histopatolojik değerlendirmeler.	101
4.19.	Histopatolojik değerlendirme.	111
4.20.	Formülasyon uygulanan ve kontrol grubuna ait değerlendirme (enfeksiyon sonrası 11. günün sonunda).	133

1. GİRİŞ

Vücutun en büyük organı olan deri, dış mikroplar ve patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturur (1). Deri epidermis, dermis ve subkütan dokudan oluşmaktadır. Derideki epidermis, vücudu fiziksel ve kimyasal tehditlere ve mikrobiyal kolonizasyona karşı koruma sağlar. Fiziksel bariyere ek olarak epidermal bariyer mikrobiyal aşırı büyümeye karşı doğal bağışıklık sunmaktadır (2). Deride bulunan komensal mikroorganizmalar, konakçı ile dengeyi koruyarak insan sağlığında önemli bir rol oynar. Derinin yaralanması durumunda, yaralı dokuda bakteriler çoğalır ve enfeksiyona neden olabilir. Yara enfeksiyonları iyileşmeyen yaralara sebep olarak yaşam kalitesini düşürür ve sağlık maliyetlerini artırır (3-5). Bu nedenle yara enfeksiyonlarında etkili tedavinin önemi artmaktadır. Günümüzde insanlarda sıklıkla görülen deri hastalıkları, küresel ölçekte büyük bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (6). Derinin bakteriyel enfeksiyonları yaygındır (7, 8). Enfeksiyonun ciddiyeti, etken organizmaya, hedef dokuya ve hastanın immünolojik durumuna bağlıdır (9). Bakteriler toprak, su, besin, bitkiler, hayvanlar ve insanlar olmak üzere her yerde bulunmakta olup çevrenin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Dünya genelindeki bakterilerin yalnızca küçük bir kısmı temas, hava veya damlacık yoluyla, vektörler ve taşıyıcı araçlar ile bulaşarak enfeksiyona neden olmaktadır (10, 11). Bakteriyel deri enfeksiyonlarının ve hastalıkların gelişiminde, patojen faktörler, konakçı durumu, çevresel ve toplumsal koşullar gibi çeşitli faktörler rol oynamaktadır (12). *S. aureus*, hem insan hem de hayvan derisinde ve mukozada bulunan burun delikleri, perine ve derinin nemli bölgelerinde komensal olarak bulunan gram pozitif bir bakteridir. *S. aureus*, çeşitli klinik enfeksiyonlara, özellikle bakteriyemi, enfektif endokardit, osteoartiküler, deri ve yumuşak doku ve pulmoner enfeksiyonlara neden olabilmektedir (13-17).

S. aureus, hem toplumda ve hastanede sık görülen enfeksiyonların nedeni olmakla birlikte dünyada antibiyotiklere karşı artan direnç, *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmaktadır. Antimikrobiyal direnç genlerinin aktarımı, hayvanlar ve insanlar arasında özellikle önemlidir (14, 18). *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı penisilin ile tedavide başarılı sonuçlar elde edilmiş olmasına karşın (19), penisilinaz enzimini sentezleyen izolatların ortaya çıkması sonucunda penisilin direnci görülmeye

başlanmıştır (20). Özellikle metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), metisilinin piyasaya sunulmasından bir yıl sonra ilk olarak 1960'lı yıllarda hastaneye kaldırılan hastalardan alınan klinik izolatlar arasında gözlenmiş ve 1990'lı yıllardan itibaren toplumda hızla yayılmıştır (21-23). İnsanda ve hayvanda görülen MRSA enfeksiyonları birbirlerini de etkilemektedir. Evcil hayvanlar MRSA taşıyıcısı olmakta ve bu bakteriyi, sahiplerine ve diğer hayvanlara bulaştırmaktadır. Benzer şekilde, MRSA'nın insandan hayvana da geçtiği bildirilmiştir (24). MRSA'nın hastane ortamlarına maruz kalan hastalarda çeşitli enfeksiyonların en sık sebebi olduğu kabul edilmiş olup bu hastane ilişkili (HA-MRSA) olarak tanımlanmıştır (25). Toplumla ilişkili metisiline dirençli *S. aureus* (CA-MRSA) ise toplumda çeşitli klinik bulgularla gelişen bir patojen olarak ortaya çıkmıştır. *S. aureus*, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının en sık görülen sebebi olmasına rağmen, invazif ve daha öldürücü hastalıklara da sebep olduğu gözlemlenmiştir (26). CA-MRSA enfeksiyonuna bağlı deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisi insizyon ve drenajı, oral veya parenteral antibiyotik tedavisini veya topikal tedaviyi içerir (27). Türkiye'de 2004-2019 yılları arasında CA-MRSA ve HA-MRSA oranı ve antimikrobiyal direnç profilleri değerlendirilmiş olup 15 yıllık süreçte CA-MRSA oranlarında anlamlı değişiklik göstermediği görülmüştür (28). Hastanede yatan hastalarda deri enfeksiyonunun ampirik tedavisine yönelik ilaçlar arasında vankomisin, linezolid, daptomisin, telavansin veya klindamisin bulunmaktadır. Ayakta tedavi gören hastalarda CA-MRSA deri enfeksiyonlarının ampirik tedavisine yönelik seçenekler arasında oral klindamisin, trimetoprim/sülfametoksazol, bir tetrasiklin veya linezolid yer almaktadır (29). Deri enfeksiyonlarının tedavisinde oral yoldan kullanılan antibiyotikler klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, doksisiklin veya minoksilin; parenteral yoldan vankomisin, linezolid, daptomisin uygulanmaktadır. Topikal olarak kullanılan antibiyotikler arasında ise fusidik asit, retapamulin ve mupirosin bulunmaktadır. Topikal uygulamanın sistemik uygulamaya göre enfekte olan bölgede daha yüksek ilaç konsantrasyonu, hasta uyuncunda artış ve sistemik uygulamada görülen yan etkilerin en aza indirilmesi gibi birçok üstünlüğü bulunmaktadır (15, 17, 27, 30-32). Antimikrobiyal direnç (AMR) nedeniyle tedavinin etkinliği azalmaktadır. Günümüzde AMR dünyanın her bölgesinde insan, hayvan ve çevre sağlığını tehdit etmektedir (33). 2014 yılında hazırlanan raporda, önlem alınmadığı takdirde AMR nedeniyle 2050

yılına kadar her yıl 10 milyon insanın ölebileceği ve ekonomide de büyük bir dönüm noktası olacağı belirtilmiştir (34, 35). AMR ile mücadelede insanlar, hayvanlar ve çevreyi bir arada göz önünde bulunduran “Tek Sağlık” yaklaşımı ön plana çıkmaktadır. Tek Sağlık, yerel, bölgesel, ulusal ve küresel düzeylerde çalışan, iş birlikçi, çok sektörlü ve disiplinler arası bir yaklaşımdır ve insanların, hayvanların, bitkilerin ve bunların paylaştıkları çevrenin birbiriyle bağlantısını kabul ederek en iyi sağlık sonuçlarına ulaşmayı hedeflemektedir. Tek Sağlık çerçevesinde, MRSA enfeksiyonları ile mücadelede beşeri ve veteriner alanların birlikte çalışması önemli ve gereklidir.

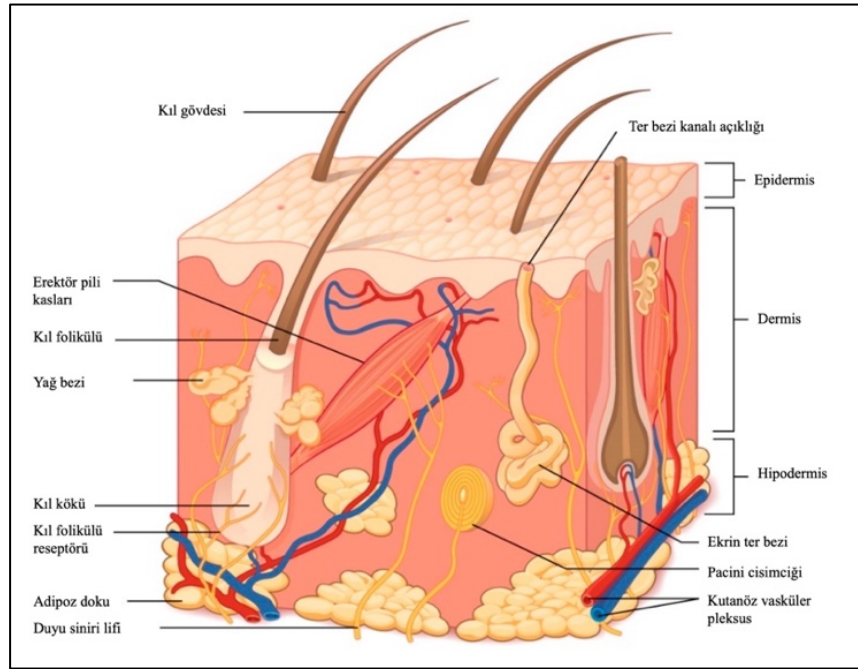
Bu tezde özellikle MRSA kaynaklı deri enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotik direncine karşı etkinliği artırılmış jel formülasyon/ları geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla etkin madde olarak hem beşeri hem veteriner alanda yaygın olarak kullanılan bir antibiyotik olan fusidik asit ve sodyum tuzu (sodyum fusidat) ve son yıllarda antibiyotik direncine karşı alternatif olarak kullanılan faj endolizininine örnek olarak rekombinant üretilmiş LysSA10 endolizini kullanılmıştır. Deriye uygulanabilecek etkinliği artırılmış bir formülasyon enfeksiyonun erken tedavisinde önemli olacaktır. Enfeksiyonun insanlar ve hayvanlar arasında birbirine bulaşma sonucu, türler arası yayılması ve iyileşme sürecinin uzaması söz konusudur. Tek Sağlık kapsamında, veteriner ve beşeri disiplinler arasında işbirliği kapsamında her iki canlı grubuna da güvenle uygulanabilecek bir formülasyon geliştirilmesi amaçlanmıştır.

- Bu amaçla, tez kapsamında antibiyotik olan fusidik asit veya sodyum fusidat ve antibiyotiğe alternatif olarak sentezlenen endolizin seçilmiş ve kitosan bazlı jel formülasyonları geliştirilmiştir. Ayrıca antibiyotik+endolizin kombinasyonu da incelenmiştir. Geliştirilen formülasyonlar öncelikle in vitro olarak (adezyon, in vitro salım, hücre canlılığı, antimikrobiyal aktivite) incelendikten sonra çalışma sonucu gerek uygulama kolaylığı gerek etkinliği yönüyle uygun bulunan formülasyonlar üzerinde subkütan enjeksiyonla enfekte edilen BALB/c farelerde in vivo çalışmalar (bakteriyel yük, histopatolojik inceleme, MPO aktivitesi tayini, sitokin düzeyi tayini) yapılarak etkinlikleri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Özellikleri

Deri vücuda kimyasallar, mikroplar, termal hasar ve radyasyon gibi zararlı dış uyarılardan korunma da dahil olmak üzere birçok koruyucu ve homeostatik fonksiyon sağlamaktadır. Deri sıcaklık ve kan basıncının düzenlenmesine de önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Homeostazisin korunmasındaki kritik rolü nedeniyle deri, vücuttaki diğer organlardan farklı, benzersiz, çok katmanlı bir yapıya sahiptir (36-38). Deri, en dış kısımdan başlayarak epidermis, dermis ve subkütanöz doku tabakalarından oluşmaktadır (39, 40) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Derinin yapısı (41).

Stratum korneum epidermisin en dış tabakası olup sürekli olarak dış ortama maruz kalır ve birincil geçirgenlik bariyeri fonksiyonu sağlamaktadır. Stratum korneumun yapısı “tuğla ve harç” olarak tanımlanmaktadır (42). Epidermis neredeyse tamamen keratinositlerden oluşur ve çevresel tehditlere karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Uzun süre sadece fiziksel bariyer olarak düşünülen keratinositler, günümüzde bağışıklık sistemine katkıda bulunan aktif hücreler olarak kabul edilmektedir (43). Keratinositlerdeki protein tabakası, kolesterol, serbest yağ asitleri ve seramitlerden oluşan hücreler arası lipit harcı arasına yerleştirilen tuğla görevi

görmektedir. Stratum korneum seçici geçirgen olup yalnızca lipofilik bileşiklerin alt katmanlara geçişine izin vermektedir. Avuç içleri ve ayak tabanları gibi yüksek sürtünmenin oluşacağı yüzeyler dışında, vücudun büyük bölümünde stratum korneumun kalınlığı 10-15 µm aralığındadır (37, 42, 44).

Stratum korneumun altında yer alan canlı epidermal tabaka ~100 µm kalınlığında olup melanositler ve derinin immün yanıtında antijen sunan hücreler olarak görev yapan Langerhans hücreleri epidermiste bulunmaktadır. Epiderminin altında yer alan dermis yaklaşık 1 mm kalınlığında ve deriyi besleyen zengin bir kılcal pleksus içermektedir (45). Dermiste, ağrı, sıcaklık ve basınç için sensör sinirleri ve zengin bir lenfatik ağı bulunmaktadır. Dermis, diğer yapısal lifler ve temel maddelerin yanı sıra kolajen ve elastinin yoğun ağ yapısı aracılığıyla deriye büyük yapısal destek sağlamaktadır. Saç folikülleri ve ektrin bezleri gibi deri uzantıları dermiste yapısal destek arasında bulunmaktadır. Dermisin altında kan damarlarını ve adipositleri içeren subkütan doku bulunmaktadır. Subkütan doku enerji için lipitleri depolamaktır (39, 46). Sağlıklı insan derisinin pH'sı 5,4–5,9 arasındadır. İnsan derisi asidik bir pH'ya sahiptir ve bu durum derinin potansiyel patojenlere karşı koruyucu bir işlev gördüğünü göstermektedir. Derinin pH'sının 5,4–5,9 olması, mikroorganizmaların deride yaşamasını zorlaştırır. Ayrıca, deri ile kan pH'sı (pH 7,4) arasındaki fark, mikroorganizmalar deri bariyerini aşarsa, vücut için ek bir savunma mekanizması sağlamaktadır. Bu durum, derinin hem fiziksel hem de kimyasal bir savunma görevi gördüğünü göstermektedir (47).

2.1.1. Deriden Geçiş Yolları

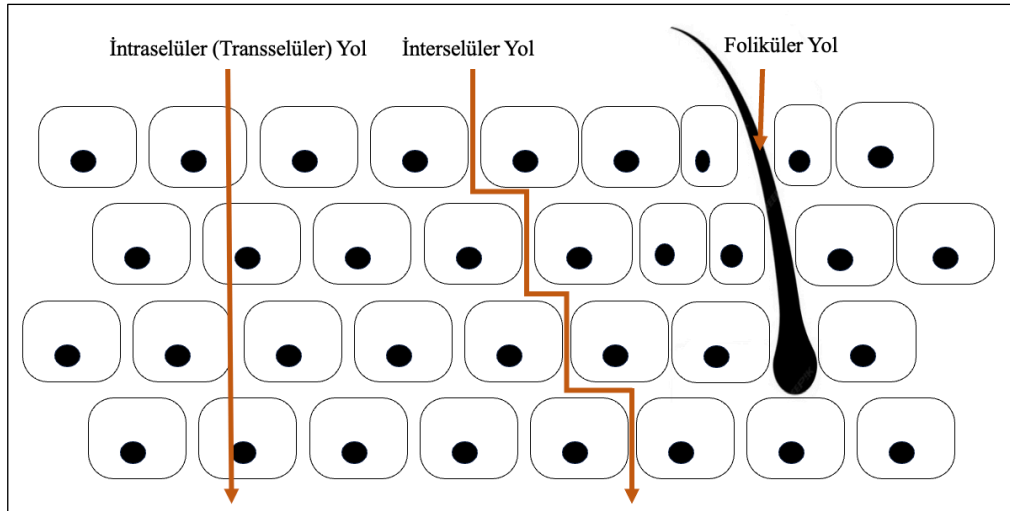
Deride, stratum korneumun mekanik bariyerleri ve interfoliküler epidermiste ve saç foliküllerinde sıkı bağlantı noktaları (tight junctions) bulunmaktadır (48). Stratum korneumdan sonra gelen ikinci önemli koruma mekanizması sıkı bağlantı noktalarıdır. Dermis ve epidermis arasında yapısal proteinler ve karbonhidratlardan oluşan yoğun bir ağ oluşturan bazal membran veya membranın altındaki kan damarları gibi derinin diğer kısımları ilacın difüzyonunu ve sistemik dolaşıma geçişini sınırlayabilmektedir (49).

İlaçların deriye topikal veya transdermal olarak uygulanması, etkin maddenin deride ne kadar derine inmesi gerektiğini belirlemektedir (40). Sistemik etki için etkin

maddenin epidermisten geçip daha derinde olan dermise ulaşması gerekirken lokal etki için etkin maddenin stratum korneumda geçmesi yeterli olacaktır. İki farklı etki için etkin maddenin farklı derinliklere ulaşılması gerekmektedir (40).

Uygulama alanı, temas süresi, deri hidrasyon derecesi, kişinin yaşı, cilt ön işlemleri, penetrantın fizikokimyasal özellikleri ve konsantrasyonu stratum korneumun bariyer fonksiyonunun etkinliğini etkileyebilecek parametrelerdir (50). Moleküllerin çoğunluğu stratum korneumu korneositler arasında yer alan lipit matriksten geçen hücreler arası yol küçük hidrofobik moleküllerin hücreler arasındaki sıkı lipit bağlantılarından uzun bir yolla nüfuz etmesine izin vermektedir (50-52).

İlaç molekülleri, stratum korneumdan hücre içi (interselüler veya transselüler), hücreler arası (interselüler veya paraselüler) ve ter ve yağ bezleriyle (foliküler) olmak üzere üç ana yolla taşınabilir (Şekil 2.2.). Hücre içi yolda, ilaç molekülü keratinden oluşan korneositlerin içinden geçer, sulu bir ortamda yayılır ve hücreler arası lipit alanlarına ulaşır. Hücreler arası yolda ise, molekül korneositler arasındaki lipit çift katmanlarından geçer ve lipit alanları içinde kıvrımlı bir yol izleyerek difüze olur (42, 53).



Şekil 2.2. İlaçların deriden geçiş yolları.

Moleküllerin epidermisten geçişinde pasif difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon ve taşıyıcı proteinler ve aktif transport olmak üzere üç farklı geçiş mekanizması bulunmaktadır (54).

Pasif difüzyon, moleküllerin hücre zarından geçişinin en basit mekanizması olup moleküller fosfolipit çift tabakada çözünür, bu tabakadan difüze olarak geçer ve

zarın diğer tarafındaki sulu çözeltide çözünür (55). Bu aşamada zar proteinleri yer almaz ve taşıma yönü, molekülün hücre içi ve dışı konsantrasyonlarına bağlı olarak belirlenmektedir. Moleküller her zaman yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru geçmektedir. Kolaylaştırılmış difüzyon, pasif difüzyon gibi, moleküller hücre zarındaki konsantrasyon gradyanına göre hareket etmektedir. Ancak, kolaylaştırılmış difüzyon sırasında moleküller, fosfolipid çift tabaka çözünmez ve zar proteinleri tarafından taşınır. Bu proteinler, moleküllerin zarın hidrofobik iç kısmıyla doğrudan etkileşmeden geçişini sağlar. Aktif transport, molekülleri, konsantrasyon gradyanına karşı, düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru taşır. Bu aşamada, ATP gibi başka bir reaksiyondan sağlanan enerji ile gerçekleşir (56).

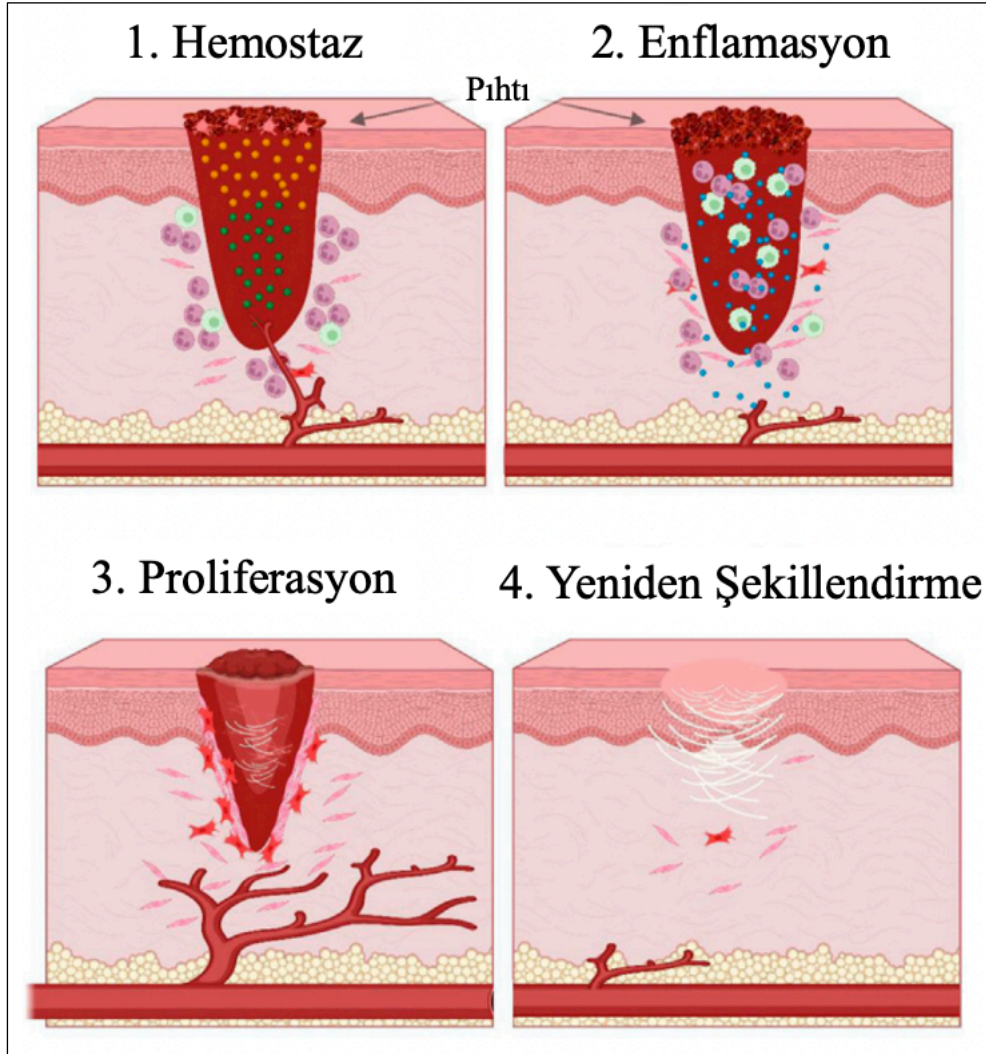
2.1.2. Yara İyileşmesi

Yara, dokunun anatomik ve hücrel devamlılığının bozulmasıdır ve bu bozulma, aniden meydana gelebileceği gibi cerrahi kesiler gibi bilinçli olarak da oluşabilir (57, 58). Genellikle deri ülseri gibi yaralar kronik ve bıçak kesigi gibi yaralar akut olarak sınıflandırılırlar. Kronik yaralar, metabolik bozukluklardan kaynaklanan yaralar olup bu yaraların iyileşmesi, kısa sürede iyileşen akut yaraların aksine daha çok zaman almaktadır. Travmatik yaralanmaları içeren çevresel faktörlerden kaynaklanan yaralara akut yaralar denir. Bu yaralar, hücrelerin ve ekstraselüler matriks üretiminin ve degradasyonu arasında bir dengeye sahiptir ve bu nedenle düzenli bir şekilde iyileşmektedir (59).

İnsan vücudunda normal bir biyolojik süreç olan yara iyileşmesi, dört evreden oluşmaktadır (60, 61);

- hemostaz evresi
- enflamasyon evresi
- proliferasyon evresi
- yeniden şekillendirme evresi

Bir yaranın başarılı bir şekilde iyileşmesi için, dört evrenin (Şekil 2.3.) de doğru sırayla ve yeterli zaman diliminde gerçekleşmesi gerekmektedir. Birçok faktör bu sürecin bir veya daha fazla aşamasına etki edebilmektedir (60, 61).



Şekil 2.3. Yara iyileşme evreleri (62).

Hemostaz Evresi (Hemen)

Hemostaz, iyileşme sürecinin başlatıcı adımıdır. Enflamasyon vazodilatasyona ve artan vasküler geçirgenliğe neden olmaktadır. Yaralanmadan hemen sonra ilk olarak kanamayı kontrol edilir ve yaralanan kan damarı vazokonstriksiyon yapar ve endotel ve yakındaki trombositler pıhtılaşma yalağını içsel kısmını aktive etmektedir. Oluşan pıhtı kollajen, trombositler, trombin ve fibronektinden oluşur ve bu faktörler enflamatuvar yanıtı başlatan sitokinleri ve büyüme faktörlerini serbest kalmasını sağlar (63). Enflamatuvar yanıt sırasında, enflamatuvar mediyatörler, özellikle proinflamatuvar sitokinler, hemostatik sistem üzerindeki etkilerde merkezi bir rol oynamaktadır. Enflamasyon kaynaklı hemostatik sistemin aktivasyonunun ana mediyatörler, proinflamatuvar sitokinler tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α),

interlökin 1 (IL-1) ve interlökin 6'dır (IL-6). Enflamatuvar mediyatörler, endotel hücre disfonksiyonu, artmış trombosit aktivasyonu, doku faktörü aracılı plazma pıhtılaşma kaskadının aktivasyonu, fizyolojik antikoagülan yollarının bozulmuş fonksiyonu ve baskılanmış fibrinolitik aktivite dahil olmak üzere bir dizi mekanizmada hemostatik sistemin bozulmasına neden olmaktadır (64). Miyeloperoksidaz (MPO) enzimi, hücre ve dokuların yaralanmasının ilk belirtisi olarak nötrofillerden salgılanan hem içeren bir proteindir. MPO konsantrasyonlarının akut iyileşen yaraların yara sıvısında, bası ülseri dokularında bulunanlara kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğunu göstermiştir. İyileşme sürecinden önce ve sonra MPO içeren yara sıvısının yara iyileşmesi ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı tedavi hakkında önemli biyokimyasal belirteçtir. Yara iyileşmesinin ilerlemesinin izlenmesinde, MPO enziminin bir yaranın genel durumu hakkında güvenilir tanısal bilgi sağladığı gösterilmiştir (65, 66).

Enflamasyon Evresi (1-3. Gün)

Yara iyileşmesinin bu aşamasının temel amacı enfeksiyonu önlemektir. İlk yanıt olan nötrofiller, hasardan bir saat sonra yaraya sızan ve ilk 48 saat boyunca sürekli yüksek seviyelerde yaraya göç eden oldukça hareketli hücrelerdir. Bu, tamamlayıcı kaskad, interlökin aktivasyonu ve nötrofillerin kimyasal bir gradyandan yaraya doğru geçmesine yol açan dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) sinyali dahil olmak üzere çeşitli kimyasal sinyal mekanizmaları aracılığıyla sağlanır; bu işlem kemotaksi olarak adlandırılır. Nötrofillerin döküntüleri ve bakterileri yok etmek için üç ana mekanizması vardır. İlk olarak, mikroorganizmaları doğrudan yutabilir ve yok edebilirler; bu işlem fagositoz olarak adlandırılır. İkinci olarak, nötrofiller degranüle olabilir ve çeşitli toksik maddeler (laktoferrin, proteazlar, nötrofil elastaz ve katepsin) salabilir ve bu da bakterileri ve ölü konak dokularını yok eder (67). Bakteriler bu düzenli yara iyileşme sürecinin bozulmasına neden olabilir ve iyileşme süreçlerinin her birini etkileyebilmektedir. Yara iyileşmesi üzerindeki enfeksiyonun değiştirici etkisi ve cerrahi bir yara enfekte olduğunda onarımın durduğunu bildirilmiştir. Yara iyileşme aşamalarında yer alan aşamaların her biri, dokudaki bakterilerin varlığıyla özel olarak düzenlenmektedir. Düşük bakteri seviyeleri, fibroplazi gibi bazı süreçleri vurgularken, daha yüksek doku bakteri seviyeleri aşamaları ciddi şekilde engellemektedir (68).

Proliferasyon evresi (3-14. gün)

Fibroblastlar ve endotel hücreleri bu fazda çoğalan birincil hücrelerdir. Fibroblastlar çevredeki dokudan yara bölgesine göç eder. Endotel hücreleri yaraya yakın sağlam venüllerden çoğalır ve anjiyogenez süreciyle yeni kılcal damarlar oluşturur. Bu iki hücre tipinin çoğalması büyüme faktörleri ve sitokinler esas olarak trombositlerden ve aktive edilmiş makrofajlardan kaynaklanır ve fibrin pıhtısında depolanır. Mezenkimal hücrelerin kendileri otokrin bir şekilde büyüme faktörleri ve sitokinler salgılamayı uyarabilir. Çevredeki dokudaki fibroblastların, replikatif olmadıkları durgun durumlarından aktive olmaları gerekir. PDGF ve EGF gibi büyüme faktörlerinin çoğu, fibroblastların kemotaksisini ve çoğalmasını indükler ve ayrıca replikasyonlarının güçlü uyarıcılarıdır (69).

Yeniden Şekillendirme Evresi (1 Hafta – Birkaç Hafta)

Yara iyileşmesinin son aşaması normal epitelin gelişimi ve yara dokusunun olgunlaşmasıyla sonuçlanır. Bu aşama, yaraya biriken kolajen ve diğer proteinler daha iyi organize hale geldikçe sentez ve bozunma arasında bir dengeyi içermektedir. Sonunda, yaralanmamış dokuda görülen yapıya benzer bir yapıyı yeniden kazanılır (67).

2.2. Antimikrobiyal Direnç (AMR) ve Tedavi Stratejileri

Dünya Sağlık Teşkilatı (DST), antimikrobiyal direncin bakteriler, parazitler, virüsler ve mantarların neden olduğu giderek artan enfeksiyonların etkili bir şekilde önlenmesi ve tedavisini tehdit ettiğini bildirmektedir (33). DST, AMR'yi, bakterilerin, virüslerin, mantarların ve parazitlerin zamanla değişerek ilaçlara yanıt vermemesi durumu olarak tanımlamaktadır. Antibiyotikler, antiviral, antifungal ve antiparazitik ilaçlar dahil antimikrobiyaller insanların, hayvanların ve bitkilerin enfeksiyonlarını önlemek ve tedavi etmek için kullanılmaktadır. AMR, bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitlerin zamanla değişerek ilaçlara yanıt vermemesi durumunda meydana gelmektedir. AMR enfeksiyonların tedavisini zorlaştırarak hastalıkların yayılma, şiddetli hastalıklar ve ölüm riskini artırmaktadır. Sonuç olarak, ilaçlar etkisiz hale gelir ve enfeksiyonlar vücutta devam eder, bu da başkalarına yayılma riskini artırır.

Antimikrobiyal direnç geliştiren mikroorganizmalar bazen "super bugs" olarak adlandırılmaktadır (33).

Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (DHST) "Tek Sağlık" yaklaşımını, insan, hayvan ve bitki sağlığının birbirine bağımlı ve buldukları ekosistemlerin sağlığıyla bağlantılı olduğunu ifade eden, bir yüzyılı aşkın bir süredir bilinen bir kavram olarak özetlemektedir (70). Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO) ve Birleşmiş Milletler Çevre Programı, "Tek Sağlık" yaklaşımını insanların, hayvanların, bitkilerin ve ekosistemlerin sağlığını sürdürülebilir bir şekilde dengelemeyi ve optimize etmeyi amaçlayan entegre ve birleştirici bir yaklaşım olarak tanımlamaktadır (71).

DST, AMR'yi küresel sağlık için en büyük 10 tehdit arasında kabul etmektedir. Son tahminlere göre, 2019'da, küresel olarak 1,27 milyon ölümün sebebi doğrudan ilaca dirençli enfeksiyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. 2050 yılına kadar ise yılda 10 milyona kadar ölüm meydana gelebileceği ön görülmektedir. AMR'nin kontrol altına alınamazsa, yıllık olarak Gayri Safi Milli Hasıla'dan 3,4 trilyon ABD doları eksiltilir ve önümüzdeki on yılda 24 milyon daha fazla insanı aşırı yoksulluğa itebileceği düşünülmektedir (72).

Antimikrobiyal dirençle mücadelede antimikrobiyal dirençli enzimleri hedef alan stratejiler; antimikrobiyal dirençli bakterileri hedef alan yöntemler; ilaç taşıyıcı sistemler; fizikokimyasal yöntemler gibi çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır (73). Antibiyotik araştırmalarının karşılaştığı en büyük zorluklardan biri, antibiyotikleri hücre içine iletme konusundaki hücre geçirgenliğinin zayıf olmasıdır. Antimikrobiyal taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi, antibiyotığın hücre içi alana girişini artırmak için antimikrobiyal dirençle mücadelede umut verici bir yaklaşımdır (74).

2.3. MRSA Kaynaklı Deri Enfeksiyonu

Deri enfeksiyonu, genellikle bakteriler, virüsler, mantarlar veya parazitler tarafından deride meydana gelen enfeksiyonlardır (75). En yaygın bakteriyel deri enfeksiyonu patojenleri *S. aureus* ve A grubu β -hemolitik streptokoklardır. Herpes simpleks en yaygın viral deri hastalıklarından biridir. Deri enfeksiyonları, enfeksiyon bölgesinde ağrı, şişlik ve kızarıklık, ateş ve sistemik belirtiler, yara iyileşmesinin gecikmesi, kronik enfeksiyonlar, sepsis veya apse oluşumu gibi ciddi sağlık sorunları ve sosyal izolasyon gibi psikolojik etkileri bulunmaktadır (76, 77). Derinin birincil

bakteriyel enfeksiyonu epidermis, dermis veya subkütan dokuyu içerebilirken, yumuşak doku enfeksiyonları fasya veya kaslara daha derinlere uzanmaktadır. Yüzeysel deri enfeksiyonları esas olarak epidermis ve dermis ile sınırlıdır, ancak sekonder enflamasyon subkutisi içerebilir. Deri bakteriyel enfeksiyonu meydana geldiğinde, oluşan lezyonun türü ve derinliğinin tanınması olası nedensel etkenin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır (78).

Deri enfeksiyonları her yaş grubunu, cinsiyeti ve ırkı etkileyebilmektedir. Deri enfeksiyonları genellikle komplikasyonsuz olmasına rağmen sistemik hastalığa veya yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyona yol açabilmektedir (79). *S. aureus*, Firmicutes filumunun Gram pozitif, hareketsiz, koagülaz pozitif kokoid bir bakterisidir (80). *S. aureus*, hem apse hem de selülit gibi pürülan cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir (15). *S. aureus* öncelikle komensal fakat aynı zamanda fakültatif bir patojendir (14). Penisilin keşfedildiğinde *S. aureus* penisiline son derece duyarlı olup *S. aureus* enfeksiyonları "mucize ilaç" ile etkili bir şekilde tedavi edilmiştir (81). Bununla birlikte, birkaç yıl içinde *S. aureus*, farklı *S. aureus* türleri arasında hızla yayılan bir plazmid tarafından kodlanan, penisilinaz adı verilen spesifik bir enzimin üretimi yoluyla penisilini yok etme yeteneğini kazanmıştır (82). Stafilokokal penisilinazın yıkıcı etkisine direnmek üzere özel olarak tasarlanmış modifiye bir penisilin olan metisilin, 1959'da terapötik amaçla kullanıma sunulmuş olup 2 yıl sonrasında ilk MRSA vakası bildirilmiştir (21, 83). Enfeksiyonun tedavisi, dirençli *S. aureus*'un, özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un ve vankomisine dirençli *S. aureus*'un (VRSA) sürekli ortaya çıkması nedeniyle karmaşık hale gelmiştir (84). Bu nedenle, artan antibiyotik direnciyle mücadele etmek için yeni alternatiflerin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Antimikrobiyal direnç, küresel ölçekte artarak klinik ve toplum sağlığı üzerinde ciddi etkiler yaratmaktadır. Bu direnç ile "Superbugs" gelişmesi ve antibiyotiklerin çeşitli çevresel alanlarda yayılması nedeniyle kontrolü zorlaştırmaktadır. Bu sorunu çözmek için uluslararası, ulusal ve yerel stratejiler önerilmiştir. Önerilen başlıca yaklaşımlar arasında antibiyotiklerin rasyonel kullanımı, reçetesiz antibiyotik satışın düzenlenmesi, el hijyeninin artırılması ve enfeksiyon kontrolünün iyileştirilmesi yer almaktadır. Ayrıca, direnç mekanizmalarının anlaşılması ve yeni ilaç ve aşıların geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir (85).

1961'den beri dünya çapında hastane enfeksiyonlarına neden olan en yaygın patojen olan MRSA, bir çok ülkede zamanla görülme sıklığı artmıştır (86). MRSA, penisilinler ve sefalosporinler tarafından temsil edilen bir antibiyotik sınıfı olan hemen hemen tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençlidir (87). Metisilin direnci, *S. aureus*'ta, kromozom tarafından kodlanan bir protein olan penisilin bağlayan bir proteinin mutasyonu sonucu oluşmuştur. Bu tür direnç mekanizması *S. aureus* organizmaları arasında bakteriyofajlar aracılığıyla aktarılmakta olup faj transdüksiyonu yoluyla kromozom aracılı ilaç direncinin örneklerinden birini oluşturmaktadır (88). Onlarca yıldır metisiline dirençli *S. aureus*, yüksek riskli hastalarda enfeksiyonlara neden olan çoklu dirençli hastane kaynaklı patojenlerin örneği olarak kabul edilmiştir. Sağlık sistemindeki değişiklikler ve bu çok yönlü mikroorganizmanın evrimi, MRSA'yı hem hastanede yatan hastalarda hem de böyle bir risk faktörü olmayan hastalarda toplum kaynaklı enfeksiyonların bir nedeni haline getirmiştir (89). MRSA enfeksiyonunun insidansı ve prevalansı dramatik bir şekilde artmaktadır. Bildirilen MRSA enfeksiyonu insidansı %7 ile %60 arasında değişmektedir (88).

MRSA'nın sadece belirli risk faktörü taşıyan insanlarda değil taşımayan çocuk ve yetişkinlerde de enfeksiyonlara neden olduğu görülmüştür. Toplum kaynaklı MRSA enfeksiyonları (herhangi bir hastane ve tıbbi müdahale öyküsü olmayan insanlarda olan) genellikle deri ve yumuşak dokuları etkilemekle birlikte sağlıklı bireylerde de yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar gelişebilmektedir. Evcil hayvanlarda MRSA'nın görülmesi, hayvan sağlığı açısından endişe yaratmakta ve hayvanların insanlara enfeksiyon bulaştırma potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir (90). Yapılan çalışmalarda yüksek MRSA kolonizasyonu ve aynı evde yaşayan insanlar ile evcil köpek ve kedilerde ayırt edilemeyen suşların tespit edilmesi, türler arası MRSA bulaşının mümkün olduğunu göstermektedir (24). MRSA insandan hayvana ve hayvandan insana bulaşabilen bir bakteri olup, evcil hayvanların enfekte insanlardan MRSA'yı taşıyabilmesi, bu durumun insanlara yeniden enfeksiyon riski oluşturması nedeniyle halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır (91-93).

2.4. MRSA Kaynaklı Deri Enfeksiyonu Tedavisi

Enfeksiyonların tedavisine yaklaşım enfeksiyonun durumuna göre değişmekte olup basit apseler veya çıbanlar yalnızca insizyon ve drenajla tedavi edilebildiği gibi

şiddetli veya yaygın apselerde antibiyotiklerle tedavi önerilmektedir (30, 94, 95). Tedavide kullanılan antibiyotiklerden penisilin ve metisilin direncinin artması bazı yeni antibiyotik sınıflarının (kinolonlar, 2. nesil oksazolidinon, peptidomimetik, 2-piridon ve ene-amid sınıfı antibiyotikler) geliştirilmesini sağlamıştır. MRSA hala ciddi bir küresel tehdit oluştursa da, doktorların artık MRSA enfeksiyonlarını tedavi etmek için daha çok seçeneğe sahiptir (96). MRSA'ya karşı linezolid, daptomisin, seftarolin, seftobibrole, tigesiklin, telavansin, oritavansin, tedizolid, dalbavansin gibi geniş bir antibiyotik yelpazesi mevcut olup, bu gelişme büyük ilaç şirketlerinin sürekli yatırımları sayesinde olmuştur. Ancak, bu yeni ilaçlara karşı dirençli MRSA suşları bildirilmiştir (97-99). Antibiyotik direnci krizinin önüne geçmek için, yeni antimikrobiyal hedeflerin keşfi ve bakteriyofajlar, QS inhibitörleri ve antikorlar gibi alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması önem kazanmaktadır (100-103).

Antimikrobiyal direnç ile mücadelede çeşitli formülasyon stratejileri geliştirilmiştir (104). Bu stratejiler arasında farklı antibiyotiklerin veya antimikrobiyal maddelerin kombine kullanımı direnç gelişimini azaltabilir ve tedavinin etkinliğini artırabilir (105, 106). Bir diğer strateji hedefe yönelik taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesidir. Antibiyotiklerin hücre içine geçişini artırmak için partiküler veya veziküler ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak etkinlik artırılabilir (107-109). Nanoteknoloji bazlı taşıyıcı sistemler, ilacın bozunmasını azaltarak, enfeksiyon bölgelerinde birikimi artırır ve toksisiteyi azaltarak terapötik etkinliği iyileştirmek için giderek daha uygulanabilir seçenekler olarak değerlendirilmektedir. Nanopartiküller yalnızca antibiyotikler ve antimikrobiyaller için taşıyıcı olarak değil, aynı zamanda bakterilerle aktif olarak savaştıkları için çoklu ilaç direnci olan bakterilere yönelik etkili olmaktadır. Bununla birlikte, yüklü nanopartiküller, yüzeylerine bağlandıklarında veya bir yapı içinde enkapsüle edildiklerinde ilacı enfeksiyon bölgesine güvenli ve etkili bir şekilde taşıma kapasitesine sahiptir (110).

2.4.1. Sistemik Tedavi

MRSA deri enfeksiyonlarında ağrı ve enfeksiyonun yönetimi için sıklıkla sistemik tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Sistemik tedavi sonucunda yan etkiler, ilaç etkileşimleri ve yaralı bölgede düşük lokal ilaç konsantrasyonu gibi sorunlar ortaya çıkarmaktadır (111-113). MRSA kolonizasyonu, enfeksiyondan daha yaygın olup

kolonize olmuş ülserlerin tedavisi sistemik tedavi gerektirmektedir. Selülit, osteomyelit veya bakteriyemi tedavisinde sistemik tedavi tercih edilmektedir. Diyabet hastalarında bulunan ayak ülserlerinde tedavi kolonizasyonun hızla enfeksiyona dönüşebilmesi sebebiyle önemlidir (114). Enfekte kronik yaraların tedavisinde nekrotik dokunun temizlenmesi, antibiyotik uygulanması ve yaranın kapatılması gereklidir. Sistemik antibiyotikler geniş bir kullanımı olsa da bazı kronik yaralarda rutin kullanımları yeterli olmamaktadır (115).

AMR önemli bir sağlık tehdidi olmakla birlikte özellikle hastane ve toplumla ilişkili MRSA (HA- MRSA ve CA-MRSA) suşları, yüksek morbidite, mortalite ve ekonomik maliyetlere neden olmaktadır. CA-MRSA'nın deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarını tedavi etmek için çeşitli oral ve parenteral antibiyotikler kullanılmaktadır (27, 96). Toplum kökenli metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, impetigo, selülit, folikülit, karnbül, yumuşak doku apse, piyomyozitis, orbital selülit ve nekrotizan fasiit gibi çeşitli cilt ve yumuşak doku bulgularına sahiptir. CA-MRSA enfeksiyonları için tedavi seçenekleri; insizyon ve drenaj, oral antibiyotikler, parenteral antibiyotikler ve topikal tedavilerdir (27). Oral olarak Klindamisin (113, 116, 117), Trimetoprim/sülfametoksazol (118, 119), Doksisisiklin (120, 121), Minosiklin (122-124), Linezolid (125-127), parenteral olarak Vankomisin (128), Trimetoprim/sülfametoksazol (113), Klindamisin (129), Linezolid (125), Daptomisin (130, 131), Kinupristin-Dalfopristin (132), Tigesiklin (133) kullanılmaktadır.

2.4.2. Topikal Tedavi

Topikal ilaç taşıyıcı sistemler, doğrudan etki bölgesine uygulama yapılarak hedefe yönelik tedavi imkanı sağlamaktadır (134, 135). Bununla birlikte hedef bölgeye uygulandığı için sağlıklı dokuların ilaçla temasını azaltır ve istenmeyen yan etkileri en aza indirir. Topikal uygulanan sistemler lokal etki gösterir ve sistemik yan etkileri azaltır. Ayrıca hastaya kullanım kolaylığı sağlar ve kontrollü ilaç salımı sağlanır. Deri hastalıklarında tercih edilir ve hasta uyuncunu artırır. Deri enfeksiyonlarının tedavisinde, tedavi protokolü lezyonun tipi (akut, subakut veya kronik) (136), lezyonun bulunduğu bölgedeki derinin kalınlığı ve hastanın yaşı (137) gibi faktörlere göre belirlenmektedir (9). İnsanlarda ve hayvanlarda deri enfeksiyonlarının topikal tedavisinde şampuan (138-140), köpükler (141), çözeltiler (142), süspansiyonlar

(142), losyonlar (143, 144), jeller (145), kremler (146, 147) ve merhemler (148) gibi dozaj şekilleri kullanılmaktadır.

MRSA ilişkili deri enfeksiyonlarının topikal tedavi stratejileri arasında yaygın olarak kullanılan antibiyotik olan fusidik asit bulunmaktadır (149, 150). Fusidik asit içeren krem ve merhem MRSA ilişkili enfeksiyonların topikal tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (151-153). MRSA ilişkili deri enfeksiyonlarının topikal tedavi stratejileri arasında kullanılan bir diğer antibiyotik olan mupirosin in vitro ve in vivo olarak MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde oldukça etkili olduğu kanıtlanmış ve MRSA yanık yarası enfeksiyonunda mupirosin merhemiyile prospektif bir klinik çalışma yürütülmüştür (154-156). Mupirosin içeren merhem hem insanda hem de evcil hayvanlarda MRSA ilişkili deri enfeksiyonları tedavisinde kullanılmakta olup krem formülasyonu da incelenmiştir (154, 157, 158). Retapamulin, *S. aureus'a* (sadece metisiline duyarlı izolatlar) veya *S. pyogenes'e* bağlı primer impetigo tedavisi için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (159) tarafından onaylanmış topikal kullanımı olan bir başka antibiyotiktir (160). Topikal retapamulin, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) kaynaklı impetigo için %85'ten fazla etkilidir ve stafilokokal folikülit tedavisinde de kullanılabilir (161). Impetigo tedavisinde %1 konsantrasyonda merhem olarak kullanılmakta olup retapamulin in vitro olarak MRSA'ya karşı etkili olmasına rağmen, MRSA kaynaklı impetigo için sadece %64 etkinliğe sahiptir. Bu nedenle, retapamulin MRSA kaynaklı impetigo tedavisi için FDA tarafından onaylanmamıştır (162).

Tez kapsamında MRSA kaynaklı deri enfeksiyonlarının topikal yolla tedavisinde kullanılabilir, hem etkinliği artırılmış hem de AMR'ye karşı alternatif olacak bir formülasyona ulaşmak hedeflenmiştir. Bu sayede, mevcut deri enfeksiyonunun ilerleyerek sistemik boyutta daha ciddi sorunlara neden olmasının önüne geçilecektir. Geliştirilecek olan formülasyon ile, insan ve hayvan arasında enfeksiyonun geçişini en aza indirmek bu sayede taşıyıcılığı ve tekrar bulaşmayı engellemek amaçlanmıştır. Bu doğrultuda hem insan hem de hayvan sağlığı ve sağlık ekonomisine katkıda bulunması için alternatif olacaktır.

2.5. Deri Enfeksiyonlarının Tedavisinde Uygulanan Topikal Dozaj Şekilleri

Deri enfeksiyonlarında sistemik antimikrobiyal tedavi etkili olsa da, bu yaklaşım bazı yan etkiler ve maliyet artışları yaratabilmektedir. Antibiyotik direncinin artışına bağlı olarak sistemik antibiyotiklerin kullanımını zorlaştırmış ve bu nedenle topikal tedavi seçenekleri önem kazanmıştır (163). Deri enfeksiyonlarının topikal tedavisinde tozlar (164, 165), kremler (154, 166), merhemler (148, 156), jeller (167, 168), patlar (169), köpükler (170, 171), spreyleyler (172), çözeltiler (173), losyonlar (174) ve şampuanlar (175) gibi çeşitli formlarla uygulanabilmektedir. Topikal tedavi için geliştirilen formülasyon taşıyıcının yüzeyle (deri/mukoza) etkileşimi ilacın etkinliğini değiştirebildiği için önemlidir. Formülasyon ile antibiyotiğin hedef bölgeye iletilmesi, dozaj bütünlüğünün ve etkinlik süresinin korunması sağlanmalıdır (163).

Yapılan çalışmalar jellerin deri ile ilgili hastalıkların tedavisinde kullanımını için güvenli ve en etkili tedavi seçeneği olduğunu ve diğer geleneksel dozaj şekilleri ile ilişkili yan etkileri azaltmak için lokal etki amacıyla kullanıldığını göstermektedir. Topikal ilaç taşıyıcı olarak en yaygın kullanılan yarı katı preparatlar jeller, kremler ve merhemlerdir (176). Jelleri oluşturan temel jel ağı, bir jelleştirici madde ile ilaç moleküllerinin bir çözücü içerisindeki kombinasyonundan oluşmaktadır (177). Çözücünün doğasından kaynaklanan jeller organojeller ve hidrojeller olmak üzere iki çeşittir (177). Hidrojel yapı iskeleleri, doğal hücresel ortamı taklit eden üç boyutlu yapılarda hücresel yapışma ve hücresel yeniden modelleme için uygun bir ortam sağlamak üzere yarı sentetik veya sentetik hücre dışı matris görevi görür. Ek olarak hidrojeller, küçük moleküllü ilaçları ve/veya proteinleri, büyüme faktörlerini ve hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli diğer bileşenleri taşıma kapasitesine sahiptir. İlaç taşınması bağlamında hidrojeller, ilaçları lokalize etmek, etki alanındaki ilaç konsantrasyonunu arttırmak ve sonuç olarak hedeflenen bölge dışında yan etkileri azaltmak için kullanılabilir (178).

Topikal jellerin başlıca üstünlüklerinden biri, oral ilaç taşınımında karşılaşılan önemli bir kısıtlama olan ilk geçiş etkisinden kaçınma yeteneğidir. Bu, topikal tedavilerde etkinliği artırarak, ilaçların doğrudan hedef bölgeye ulaşmasını sağlar ve sistemik yan etkileri azaltır (179). Jeller, kolay kullanılabilme ve uygulanabilme

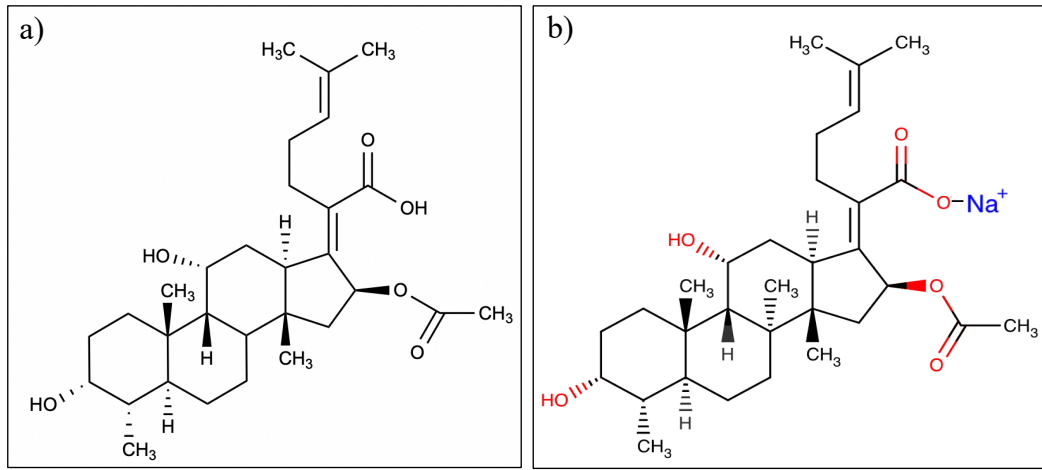
özellikleriyle hasta uyuncunu artırmaktadır (180). Jellerin yağ içermeyen ve suyla kolayca temizlenebilen yapısından dolayı merhem ve kremlerle karşılaştırıldığında hastalar tarafından daha çok tercih edilmekte olup hastaların tedaviye uyuncu artırmaktadır (181). Uygulama sonrasında advers reaksiyon gelişmesine bağlı olarak jellerin uygulandığı bölgeden kolayca uzaklaştırılabilmesi, jelleri sistemik ilaçlara göre daha güvenli bir alternatif haline getirmektedir (182). Jeller, biyolojik yarı ömrü kısa (ör. Tacrolimus) ve dar terapötik aralıklı ilaçları hedef dokulara etkili bir şekilde ulaştırabilmektedir (183). Jellerin kontrollü salım özellikleri, ilaç konsantrasyonunun terapötik aralıkta kalmasını sağlarken, ilaç miktarındaki dalgalanmaların önlenmesini sağlamaktadır (184). Bununla birlikte, jellerin bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Geçirgenliği düşük olan ilaçların dermal yolla etkili bir şekilde iletilmesi zor olmakla birlikte ilaçların derideki geçişini artırmak amacıyla permeasyon artırıcılar kullanılmaktadır (185, 186). Jellerin uygulama bölgesinde lokal deri iritasyonuna sebep olabilmektedir (187). Bununla birlikte, büyük molekül ağırlığına sahip ilaçlar, deriden geçişte zorluklarla karşılaşabilmektedir. Bu durum, ilaçların dermal penetrasyonunu sınırlayarak, terapötik etkinliği olumsuz etkilemektedir. Dolayısıyla, büyük molekül ağırlığına sahip ilaçların deri yoluyla etkili bir şekilde iletilmesi için nanoteknoloji gibi formülasyon stratejileri kullanılmaktadır (188, 189).

2.6. Fusidik Asit ve Sodyum Fusidat

Fusidik asit, fusidanlar adı verilen kendi grubuna ait bir antibiyotiktir (190). Fusidik asit, hafif ila orta şiddette impetigo, folikülit, eritrazma, furunküloz, apseler ve enfekte travmatik yaralar gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında ve hidradenitis suppurativa, kronik bacak ülserleri, yanıklar ve bası yaraları gibi enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (151). Fusidik asit, deri enfeksiyonlarında etkili bir antibakteriyel ajan olarak bakterilere karşı etki gösterir. Fusidik asit, bakterilerin ribozomlarına bağlanarak, bakteri proteinlerinin üretimini durdurur ve böylece bakteriyel büyüme ve çoğalmayı engellemektedir (191).

Fusidik asit, steroid benzeri bir yapıya sahip olup steroid aktivitesi göstermemektedir. Bu molekül bazı özellikleri steroidlerle benzerlik göstermekte ancak bir steroid değildir. Moleküler olarak fusidik asit, C₃₀ yapısal iskelete sahip bir triterpen, bir fitokimyasal izoprenoid olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.4.) (190).

Fusidik asitin steroid benzeri yapısı deriden emilimini artırır ve fusidik asidin topikal uygulamasının sistemik uygulamaya göre uygulanan bölgede çok daha yüksek konsantrasyonda olacağını ve epidermis veya dermisin daha derin tabakalarında bile fusidik asidin antimikrobiyal konsantrasyonlara ulaşabilmektedir (192, 193). Başlıca etkisi çoklu dirençli suşlar dahil olmak üzere stafilkoklara karşıdır (194). Fusidik asit, yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal özelliklere sahip, bakteriyostatik bir antibiyotiktir. Etki şekli bakteriyel protein sentezini inhibe etmektir. Yüzey proteinlerinde sonradan meydana gelen azalmalar, stafilkoklar gibi organizmaları fagositoza karşı daha duyarlı hale getirir (195).



Şekil 2.4. Fusidik asit (a) ve sodyum fusidatın (b) kimyasal yapısı.

Fusidik asit oral (tablet ve süspansiyon), topikal (krem, merhem ve jel) ve intravenöz yollardan uygulanmaktadır (194). Fusidik asit uzun yıllardan beri dermatolojide kullanılmak üzere tablet, süspansiyon, merhem ve krem olarak mevcuttur (192). Fusidik asit, Log P değeri 4.42, pKa'sı 5.7 olan zayıf bir asittir. Çoğunlukla plazmada ve dokuda 7,4 fizyolojik pH'da iyonize olur. Fusidik asidin kendisi suda az çözünür. Buna karşılık sodyum tuzu olan Sodyum fusidat suda kolayca çözünür ve pKa'sı 5.35'tir (194, 196-198). İlk klinik çalışmaların çoğu, birçok ülkede uzun yıllardır pazarlanan sodyum fusidat içeren kapsüllerle gerçekleştirilmiştir (194, 199). Sodyum fusidatın suda yüksek çözünürlüğü nedeniyle oral yolla ve intravenöz infüzyon olarak günlük 1500 mg ve merhem formunda topikal olarak klinikte uygulanmaktadır (196). Buna karşın fusidik asitin suda çözünürlüğünü düşük olması ve steroid yapısı nedeniyle klinikte krem olarak topikal uygulanmaktadır.

Fusidik asit, stafilokoklara karşı etkili olup metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) ve MRSA kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (200). Fusidik asitin toplum ve hastane kökenli MRSA ve linezolid dirençli suşlara karşı güçlü bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (201). MRSA, beta-laktam antibiyotiklere (örneğin metisilin) dirençli bir bakteri türüdür, ancak çoğu MRSA suşu fusidik asite karşı hala duyarlıdır. Bu da fusidik asitin MRSA tedavisinde etkili bir seçenek olmasını sağlamaktadır (202).

2.7. Endolizin (LysSA10)

Bakteriyofajlar veya fajlar, bakteri hücrelerini enfekte ederek bakteri metabolizmasını bozan ve bakterinin lizise uğramasına neden olan bakteri virüsleridir (203, 204). Faj tedavisi sonrasında spesifik faja karşı direnç kazanan bakteri suşları gelişmesine rağmen endolizin tedavisi sonrası faja göre daha iyi litik aktivite gösterdiği ve endolizine karşı direnç gelişmediği bildirilmiştir (205). Endolizinlerin hedef molekülün kimyasal yapısına bağlı olarak geniş konakçı spesifitesinin olması ve direnç gelişimi olmaması sebebiyle fajlara göre üstünlük göstermektedir (206). Endolizinler, bakteriyofajlar tarafından replikasyon döngülerinin sonunda bakteriyel konakçının peptidoglikanını hücre duvarı içeriden parçalayarak hidrolize edebilen ve lizise ve bakteriyel hücre ölümüne neden olabilen litik enzimlerdir (207-209). Gram pozitif bakterilere ait hücre duvarında dış zarın olmaması nedeniyle endolizinler peptidoglikana erişerek bu organizmaları yok edebilmektedir. Bu özellikleri sayesinde artan ilaç direncine karşı antibiyotiklere alternatif etkili antimikrobiyal ajanlar haline gelmiştir (210). Endolizinler (a) asetilmuramidazlar, (b) transglikozilazlar, (c) glukozaminidazlar, (d) amidazlar ve (e) endopeptidazlar olmak üzere litik aktivitesine göre farklı tiplere ayrılmaktadır (205). Endolizinler, kısa bir bağlayıcı bölge ile bağlanan bir N-terminal enzimatik olarak aktif alan ve bir C-terminal hücre duvarı bağlayıcı alandan oluşur. Endolizinler etkilerini, bakteri hücre duvarının peptidoglikan tabakasına bağlanarak ve memeli hücrelerinde bulunmayan yapılar olan N-asetilmuramik asit (NAM) ve N-asetilglukozamin (NAG) alt birimleri arasındaki glikozidik bağı kesmek için N-asetilmuraminidaz aktivitesi dahil olmak üzere özel mekanizmalar ile keserek göstermektedir (211).

Endolizinlerin konvansiyonel geniş spektrumlu antibiyotiklere göre en büyük üstünlüğü yüksek özgüllükleridir (212). Endolizinler, spesifik bakterisidal aktivite gösterir ve yararlı mikrobiyotayı öldürmezler. Moleküler mühendislik yoluyla, bir endolizinin litik spektrumu değiştirilebilir (213). Bununla birlikte endolizinlerin hızlı bakteri hücresi lizisi, düşük direnç riski, farklı antibakteriyel maddelerle sinerjik aktivite ve biyofilmlerde ve mukozal yüzeylerde etkili olma yeteneği gibi diğer avantajları da bulunmaktadır. Bu özellikler nedeniyle, endolizinler ilaca dirençli patojenleri yok etmede alternatif olarak kullanılmaktadır (214-216).

Endolizinlerin tedavide potansiyellerini artırmak amacıyla enkapsülasyon stratejisi kullanılmaktadır (217-221). Ancak, bakteriyofajların enkapsülasyonunun aksine, endolizinlerin taşıyıcı sistemleri henüz başlangıç aşamasındadır. Endolizinlerin protein yapılı olması ve enzimatik aktivitelerinin hassas olması nedeniyle bakteriyofaj taşıyıcı stratejilerinden daha zorludur. Organik çözücüler ve zorlu enkapsülasyon koşulları, endolizinlerin yapısını ve etkisini etkileyebilmektedir (222).

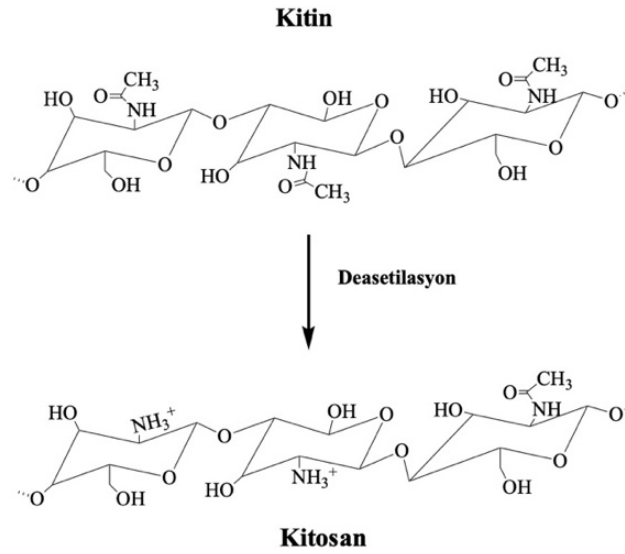
Bakteriyofaj ve endolizin taşıyıcı sistemlerin ideal bakteriyofaj veya endolizin konsantrasyonu, farmakokinetikleri ve immünomodülatör özellikleri nedeniyle klinik uygulamalarda çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır (223). Hazırlanan formülasyonların sterilizasyonu, bu taşıyıcı sistemlerinin ölçeklenmesinde büyük bir zorluktur, çünkü sıcaklığa duyarlı endolizinler yüksek sıcaklık sterilizasyonuna dayanamazlar (224). Formülasyonların tasarımı için steril koşulların kullanılması veya UV tedavisi bir başka potansiyel alternatif olsa da, maliyeti ve büyük ölçekli üretim ortamlarındaki lojistik zorlukları artırmaktadır (222, 224-226). Endolizinlerin üretim, depolama ve uygulama sırasında stabilitesi, antibakteriyel ajan olarak potansiyel kullanımları için çok önemlidir (227). Teknolojik sınırlamaların yanı sıra, düzenleyici ve hukuki çerçeve de bakteriyofaj ve endolizin taşıyıcı sistemlerin klinik ilerlemesinde bir diğer büyük engel oluşturmaktadır. Bakteriyofajlar ve endolizinler için düzenleyici ve hukuki çerçeve, daha çok yerel ve ulusal sınırlarda kalmakta olup, küresel anlamda henüz standartlaştırılmamıştır (224).

Tez çalışmasında kullanılan LysSA10 endolizini, Kılıç ve ekibi tarafından temin edilmiştir. LysSA10'un pH, sıcaklık ve iki değerlikli metal iyonlarının etkilerinin stabilitesini ve antibakteriyel aktivitesini etkilediği bildirilmiştir. pH 8.0'de

ve 35 – 50°C arasındaki sıcaklıklarda yüksek antibakteriyel aktivite (%80<) sergilediği gösterilmiştir (228). LysSA10 endolizini elde edilirken, filtrelenmiş protein lizatları, Nikel-Nitritotriasetik Asit (Ni-NTA) afinite kromatografisi sistemi kullanılarak saflaştırma için kullanılmıştır. Kısaca, Ni-Bağlayıcı tampon, Ni-NTA yerçekimi kolonuna eklenmiş ve yerçekimiyle süzölmeye bırakılmıştır. Daha sonra berraklaştırılmış süpernatant protein lizatı, Ni-yıkama tamponuyla karıştırılmış ve kolondan geçirilmiştir. Bundan sonra, kolon, bağlanmamış proteini kolondan uzaklaştırmak için Ni-yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Bu aşamada, analiz için kolondan geçen akış toplanmıştır. Yıkamanın ardından, nikel kolonda bağlı proteini elüe etmek için kolona elüsyon tamponu eklenerek son olarak elüe edilmiş protein fraksiyonları, ham lizat ve akış analiz için %12 (ağırlık/hacim) SDS-PAGE jellerinde protein ile birlikte çalıştırılarak endolizinler elde edilmiştir (228).

2.8. Kitosan

Kitosan, doğada yaygın olarak bulunan, kabuklu hayvanların ve böceklerin dış iskeletlerinin yanı sıra bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarının temel bileşeni olan glikoz bazlı bir polisakkarit olan kitinin alkalın deasetilasyonundan elde edilen, kısmen deasetillenmiş bir polimerdir (229). Kitosan, biyoyumlu, biyobozunabilir, biyoadeziv, biyoaktif özellikleri ve katyonik doğası gibi umut verici özellikleri nedeniyle geniş bir uygulama alanına sahip biyopolimerler arasında yer almaktadır (229, 230). Kitosan, deasetilasyon derecesine (DD) bağlı olarak rastgele yerleştirilmiş N-asetilglikozam grupları içeren poli[β-(1→.4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz]'dan oluşan doğrusal bir kopolimerdir (Şekil 2.5.) (230).



Şekil 2.5. Kitin ve kitosanın yapısı.

Kitosanın en önemli kimyasal özelliklerinden biri deasetilasyon derecesidir. Ayrıca deasetilasyon derecesi serbest amino gruplarının sayısını ifade eder ve böylece kitin ile kitosan arasındaki farkı ortaya koyar. Deasetilasyon işlemi, kitinin moleküler zincirinden asetil gruplarının çıkarılmasını ve tam bir amino grubunun (-NH₂) bırakılmasını içerir (230). Deasetilasyon derecesi en az %75 olan kitin, kitosan olarak bilinmektedir. Asetillenmiş ve deasetillenmiş glukozamin kalıntılarının oranı, hidrofilik ve hidrofobik etkileşimler arasındaki dengede önemli bir rol oynar (231).

Kitosanın amino grubunun pKa değeri yaklaşık 6,5 olup pozitif yüklüdür. pH ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak zayıf asidik çözeltilerde çözünür. Kitosanın mukoadesif özelliği, kitosandaki pozitif yüklü kitosan amino grupları ile mukustaki negatif yüklü sialik asit kalıntıları arasındaki iyonik etkileşim aracılığıyla sağlanır. Mukoadesif özelliği nedeniyle kitosan, ilacın uygulama yerinde tutulma süresini uzatır, böylece alımını/absorpsiyonunu artırır. Kitosanın ayrıca bileşiklerin çeşitli mukozalara nüfuzunu arttırdığı da gösterilmiştir (230).

Kitosan, farklı ilaç gruplarının oral, mukozal (buccal, dil altı vajinal, nazal, rektal), dermal, pulmoner ve parenteral gibi farklı uygulama yollarıyla uygulanması için film, jel, sünger, lif, mikro ve nanopartiküller vb. gibi çeşitli dozaj şekillerinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır (230).

Kitosanın katyonik yapısı, asidik koşullarda nano/mikropartiküller, emülsiyonlar, lifler, hidrojeller, filmler ve membranlar dahil olmak üzere birçok dozaj şeklinin oluşturulmasında kullanılmaktadır (232). Nanopartiküller daha etkili bir yara

iyileşmesi için deri boyunca ve yara bölgesinde daha iyi penetrasyon sağlayarak ve nanopartikülleri pozitif yükü sebebiyle agregasyon önelenerek stabil kalabilmektedir. Bununla birlikte kitosan bazlı nanopartiküllerin yüzeyindeki güçlü pozitif yükler, hücre yüzeyleri, mukozal yüzeyler ve bakteri hücreleri gibi birçok negatif yüklü bileşenle daha kolay etkileşime girmelerini de sağlamaktadır (233, 234). Kitosan bazlı nanopartiküller kendisinin yara iyileşmesi üzerinde etkisi olması sebebiyle tek başına veya terapötik bileşikleri hedef bölgeye (yaraya) iletmek için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (235). Kitosan bazlı nanopartiküllerin yüzey alanının fazla olması sayesinde yara iyileşme mekanizmasını aktifleştirmek için daha fazla yüzey etkileşimi sağlamaktadır. Bu özellik, aktif yara iyileştirme bileşenlerinin yara bölgesine daha homojen bir şekilde dağıtılmasını sağlamaktadır (235). Bununla birlikte, kitosan bazlı nanopartiküller ile taşınan etkin maddeler, deriye penetrasyonunu artırılır ve deride birikim gerçekleşir. Bu durum kitosan bazlı etkin madde yüklü nanopartiküllerin dermal uygulamada bir üstünlük sağlamaktadır (236). Kitosan bazlı hidrojellerin, farklı yara iyileşme aşamalarında yara iyileşmesini teşvik ettiği ve ayrıca yara iyileşmesine karşı faktörleri (aşırı enflamatuvar ve kronik yara enfeksiyonu gibi) hafifletebildiği gösterilmiştir (230). Kitosanın hem beşeri hem de veteriner alanda uygulamalarında yara iyileştirici ve antimikrobiyal ajan, bandaj materyali, hemostatik ajan ve ilaç taşıyıcı olarak kullanımı bulunmaktadır (178, 229).

Kitosan bazlı süngerler, gözenekli yapısı, biyoyumluluğu ve sıvı emme özellikleri sayesinde hemostaz için uygun bir biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Bu kompozit süngerler, kandaki suyu emerek kan viskozitesini artırabilirken, toksik olmamaları ve biyobozunur olmaları gibi avantajlar sunmaktadır. Antibakteriyel özellikleri sayesinde yaralarda kan pıhtılaşmasını destekleyerek gözenekli yapıları sayesinde hemostatik malzemeler olarak yaygın olarak kullanılırlar. Kitosan süngerlerine ilaç yüklendiği zaman yara iyileşmesini destekleyen etkili yara örtüleri olarak da işlev görmektedirler (237, 238).

Kitosan bazlı filmler, iyi geçirgen özelliği, geniş yüzey alanı ve antibakteriyel özellikleri sayesinde deri ve yara pansumanları için bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. Gama ışınına maruz bırakıldıklarında, yüzey hidrofobisitesi, geçirgenliği ve hassasiyeti, önemli değişiklikler olmadan artırılabilir. İnsan epidermal büyüme faktörleri içeren kitosan filmleri, enzimatik hidroliz ve endositoza

karşı koruma sağlarken, farelerde yara iyileşme oranını önemli ölçüde hızlandırdığı bildirilmiştir. Bu antibakteriyel ve rejeneratif özellikler, kitosanı yara örtüsü olarak kullanılmasını uygun hale getirmektedir (239).

Kitosan, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri türlerini içeren geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptir (240-244). Kitosanın *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Lysteria monocytogenes*, *Lactobacillus brevis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*'a karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır (231). Kitosanın antibakteriyel özellikleri yapısı, fizikokimyasal özellikleri ve çevre koşulları ile ilişkilidir (245).

Gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler hücre duvarı yapılarında önemli farklılıklar gösterirler; gram-pozitif bakteriler daha kalın peptidoglikanlara sahiptir ve gram-negatif bakteriler lipopolisakkarit (LPS) açısından zengindir. Bu tür bakterilerin hücre yüzeyi yapısındaki farklılıklar da kitosana karşı belirgin duyarlılıklara yol açmaktadır. Örneğin gram negatif bakteriler, gram pozitif bakterilerden daha negatif bir yük sunar çünkü LPS sıklıkla fosforile edilmiş gruplara bağlanır. Daha negatif yüklü hücre yüzeyleri, çevresel pH 6.5'in altında olduğunda katyonik kitosanın fosfolipidlere bağlanmasına izin verir. Gram-negatif bakterilerin kitosana gram-pozitif bakterilerden daha duyarlı olabileceği ileri sürülmüştür, ancak bazı çalışmalar gram-pozitif bakterilerin kitosan'a daha duyarlı olduğunu göstermiştir (245).

Gram-pozitif bakterilerdeki teikoik asitler de yapılarında fosfat gruplarının bulunması nedeniyle negatif yüklüdür. Bununla birlikte, *S. aureus*'ta teikoik asit biyosentez yolunun silinmesi, kitosana karşı direncin artmasına neden olmuştur; bu da kitosanın etki şeklinin basit elektrostatik etkileşimlerden daha karmaşık olduğunu göstermektedir (246, 247). Ayrıca gram-negatif bakterilerin aksine gram-pozitif bakterilerin kalın bir hücre duvarı vardır ve bu da kitosanın doğrudan hücre zarına bağlanmasını engelleyebilir. Ancak bazı kitosan oligomerleri (<5 kDa) hücre duvarına nüfuz eder ve DNA/RNA veya protein sentezini etkiler. Kitosanın (≤ 50 kDa) hücre duvarından geçebildiğini ve DNA transkripsiyonunu inhibe edebildiğini göstermiştir. Bu nedenle, kitosanın moleküler boyutu hedeflemede önemli bir rol oynasa da, kitosan'ın molekül ağırlığı yerine yapısı da onun hücre dışı, hücre içi veya hem hücre dışı hem de hücre içi antibakteriyel aktivitesini belirler (245).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

<u>Kimyasal Madde</u>	<u>Üretici Bilgisi</u>
APC - IL-6 (SONY 3122540)	Sony Biotech., ABD
APC- IgG1, κ izotip kontrol antikor (400412)	Biologend, ABD
Asetik Asit	Carlo Erba, Fransa
Asetonitril (HPLC grade)	Merck, Almanya
ATCC 43300	American Type Culture Collection (ATCC), ABD
ATCC 33862	American Type Culture Collection (ATCC), ABD
ATCC 6538	American Type Culture Collection (ATCC), ABD
BCA analiz kiti	Thermo Fisher Scientific, ABD
Cell strainer (542070)	Greiner Bio-One, Avusturya
Cyto-Fast™ Fix/Perm Buffer Set (426803)	Biologend, ABD
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat	Merck, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat	Merck, Almanya
Diyaliz membran (100 kDa MWCO)	Sigma Aldrich, Almanya
Diyaliz membran (12-14kDa MWCO)	Thermo Fisher Scientific, ABD
DMSO	Merck, Almanya
Dulbecco Modified Eagle Medium Ham's	Biological Industries, İsrail
FITC - Anti fare TNF alpha (SONY 3131520)	Sony Biotech., ABD
FITC - IgG1, κ izotip kontrol antikor (400405)	Biologend, ABD
Formaldehit (%37)	Merck, Almanya
Fötal Bovine serum	Capricorn Sci., Almanya
Fucidin Krem	Abdi İbrahim, Türkiye
Fucidin Merhem	Abdi İbrahim, Türkiye
Fusidik asit	Deva Holding, Türkiye
Kanlı agar	Or-Bak, Türkiye
Kitosan	Koyo Chemicals, Japonya

Kitosan (419419)	Sigma-Aldrich, Almanya
Kitosan (448877)	Sigma-Aldrich, Almanya
L929 (Fare fibroblast hücre hattı) Hücreleri	American Type Culture Collection (ATCC), ABD
Luria Bertani Broth	Lab M, UK
Mannitol Salt Agar (BK030HA)	BIOKAR, Fransa
Metanol (HPLC grade)	Merck, Almanya
MPO aktivite kiti (ab105106)	Abcam Inc, ABD
MPO tayin tamponu	Abcam Inc, ABD
MTT	Serva, Almanya
Mueller Hinton Agar (225250)	Becton Dickinson, ABD
Mueller Hinton Broth (212322)	Becton Dickinson, ABD
Orto-fosforik asit (%85)	Merck, Almanya
PBS (toz)	Advansta Inc, ABD
PE - IgG1, κ izotip kontrol antikor (400408)	Biolegend, ABD
PE - IL-17A antikor (SONY 3134520)	Sony Biotech., ABD
Penisilin-streptomisin	Biological Industries, İsrail
PerCP - IgG izotip kontrol antikor (LEIN-I-905)	Leinco Tech., ABD
PerCP - IL-1beta antikor (LEIN-I-968)	Leinco Tech., ABD
Polipropilen flow test tüpü (2523749)	Beckman Coulter, ABD
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma Aldrich, Almanya
Potasyum hidroksit	Sigma Aldrich, Almanya
Protosan (UP B 80/20)	Novamatrix, Norveç
Qubit protein analiz kiti	Thermo Fisher Scientific, ABD
Serum fizyolojik	Polifarma, Türkiye
Sheath fluid (B51503)	Beckman Coulter, ABD
Sıvı azot	Vaşak Gaz, Türkiye
Sodyum fusidat	Koçak Farma İlaç, Türkiye
Sodyum klorür	Sigma Aldrich, Almanya
Span 20	Merck, Almanya
Span 80	Merck, Almanya
Tripsin-EDTA	Biological Industries, İsrail

Triptik Soy Agar (236950)
 Tween 20
 Tween 80

Becton Dickinson, ABD
 Merck, Almanya
 Sigma Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz

CytoFLEX akış sitometrisi
 Çalkalamalı Su Banyosu
 Çok noktalı manyetik karıştırıcı
 Dijital kompas
 Franz Difüzyon Hücreleri
 Fotoğraf makinesi
 Hassas terazi
 Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (ISOTEX)
 İnkübatör
 Mikroplaka okuyucu
 Mikropipetler
 Mikroskop
 Nanodrop (BioSpec™ Nano)
 Qubit 4 Fluorometresi
 pH stripi
 Reometre
 HPLC Cihazı
 Tekstür Analiz Cihazı
 Ultra saf su cihazı
 Ultrasonik banyo (Elmasonik S)
 Ultrasonik banyo (AL04-01-230)
 Vorteks
 Zeta potansiyeli ölçüm cihazı
 C18 kolon
 Politetrafluoroetilen (PTFE) filtre
 Santrifüj (EBA 20)

Üretici Bilgisi

Beckman Coulter Inc., ABD
 Memmert
 Variomag Telesystem, Almanya
 Delixi, Çin
 İldam Cam, Türkiye
 Canon, Japonya
 Shimadzu, Japonya
 İldam Kimya, Türkiye
 Nüve, Türkiye
 Molecular Devices, ABD
 Eppendorf, Almanya
 Leica, Almanya
 Shimadzu, Japonya
 Thermo Fisher Scientific, ABD
 Isolab, Türkiye
 Brookfield DV2T Rheometer, ABD
 Shimadzu, Japonya
 TA-XT2, Stable Micro Systems
 Millipore, ABD
 ELMA, Almanya
 Advantage Lab,
 IKA, Almanya
 Malvern Instruments, İngiltere
 Waters, Milford, USA
 Isolab, Türkiye
 Hettich, Almanya

Santrifüj (Mikro 200)	Hettich, Almanya
Şırınga enjektörü	Beybi, Türkiye
Spektrofotometre (Libra S4)	Biochrom, İngiltere
Orbital çalkalayıcı inkübatör	Biosan, Letonya

3.3. Etkin Maddelere Ait Çalışmalar

Tez çalışması kapsamında etkin madde olarak fusidik asit, sodyum fusidat ve endolizin (LysSA10) kullanılmıştır. Formülasyonlarda fusidik asit ve sodyum fusidat %2 a/h konsantrasyonda, LysSA10 ise 0,5 mg/mL konsantrasyonda kullanılmıştır. Fusidik asit Deva İlaç'tan ve sodyum fusidat Koçak Farma'dan bağış yoluyla temin edilmiştir.

Çalışmalarımızda kullanılan LysSA10 endolizini, Kılıç ve ekibi tarafından temin edilmiştir. Endolizinin eldesi için LysSA10 geninin klonlandığı pET SUMO plazmitlerini taşıyan E. coli BL21 (DE3) suşunun -80°C'de saklanmış çalışma stoğundan bir vial alınarak 50 µg/mL kanamisin içeren LB sıvı besiyerinde bir gece 37°C'de 220 rpm çalkalamalı inkübatörde canlandırılmıştır. Üretilen bu kültürden protein üretim kültürleri hazırlanmıştır. Kültürler logaritmik faza (OD600nm = 0.4-0.6) kadar üretildikten sonra hücreler 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ilave edilerek protein ekspresyonu için indüklenmiş ve 20°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler pET SUMO Protein Expression System protokolünde önerilen yöntem doğrultusunda 4°C santrifüjlenerek çöktürüldükten sonra pelet yaş ağırlığının 3 katı lizis çözeltisi ile 1 saat 4 °C'de bir rotatörde karıştırılmıştır. Hücreler sonikasyon ile parçalandıktan sonra homojenize süspansiyon santrifüjlenerek süpernant yeni bir falkon tüpe alınarak endolizin içeren lizat 0.22 µm filtreden geçirildikten sonra eksprese edilen rekombinant protein SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Endolizin LysSA10 içeren E. coli hücre lizatının fonksiyonel olduğu agar damlatma yöntemi ile indüklenmemiş hücre lizatı ile karşılaştırılarak test edilmiştir. Endolizinin saflaştırma işlemine geçilmiştir. SDS-PAGE analizi sonucu çözünmüş ve yeterli konsantrasyonda rekombinant endolizin içeren E. coli hücre lizatları ProBond Purification Sistemi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırılmıştır. SDS-PAGE analizi sonucu beklenen saflıkta ve 200 - 500 µg/mL konsantrasyona sahip endolizin + His-SUMO füzyon protein solüsyonu 3 gün süre ile diyalize tabi tutulmuştur. Bunun için, yaklaşık

4 mL protein solüsyonu SnakeSkin Dialysis Tubing (10,000 MWCO, 22 mm çap) transfer edilerek 1 L diyaliz tamponu içinde (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.8) 4°C’de magnetik bir karıştırıcı yardımı ile 12 saat diyaliz edilmiştir. Diyaliz tamponu 12 saatte bir değiştirilerek diyaliz işlemine 48-60 saat devam edilecek ve diyaliz işlemi sonucu endolizin solüsyonunda bulunan imidazol konsantrasyonunun 250 mM’den pico mol (pM) düzeyine düşmesi sağlanmıştır. Diyaliz sonrası saflaştırılmış endolizin+His-SUMO füzyon proteini tekrar SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve SDS-PAGE analizi ile beklenen saflıkta olan ancak konsantrasyonu 200 µg/mL’den düşük olan endolizinler santrifüj filtreleri (Pierce™ Protein Concentrator 10K MWCO) ile 4 kat konsantre edilerek -20°C’de kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Konsantre endolizin konsantrasyonu 750 – 816 µg/mL elde edilmiştir. Kılıç ve ekibi tarafından Trabzon’dan Ankara’ya gönderilen endolizinin transfer sırasındaki koşullardan etkilenmediği teyit edilmiştir. Her bir endolizin lotu için litik aktivite tayini Agar-spot test yöntemi ile aktivite teyit edilmiştir. Agar-spot test yöntemi, her endolizin lotunun litik aktivitesi ön değerlendirmesi için Mishra ve ark. (248) yaptıkları çalışmada belirtildiği şekilde belirlenmiştir. Bu yöntem yalnızca farklı lotlardaki endolizinin litik aktivitesinin kontrol edilmesinde kullanılmıştır. Türbidite dansitometresi ile 0.5 McFarland türbiditeye sahip bakteri süspansiyonları serum fizyolojik içerisinde hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonları triptik soy agar plakları üzerine eküvyon ile yayıldıktan sonra yaklaşık 10 dk kuruması için bekletilmiştir. Endolizin içeren saflaştırılmış filtrelenmiş lizat agar yüzeyine 10 µL damlatılarak endolizin agar içine tamamen difüze olduktan sonra inkübatöre alınmış ve bir gece 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda (18-24 saat) agar yüzeyinde inhibisyon zonu oluşması ile endolizin aktivitesi tayin edilmiştir. Endolizinin aktivitesi tüm suşlar üzerinde incelenmiştir.

3.3.1. Fusidik Asit Miktar Tayini ve Validasyonu

Fusidik asitin miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır (249-253). Çalışmalar sabit faz C18 kolon ve mobil faz asetonitril:su:asetik asit (79:29:1) karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup elde edilen en iyi sistem uygunluk parametreleri doğrultusunda fusidik asit tayininde kullanılan kromatografik koşullar belirlenmiştir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Fusidik asit miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemi koşulları.

Mobil faz	Asetonitril:su:asetik asit (79:29:1)
Kolon	Waters C18 150x4.6 mm, 5 µm
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Akış hızı	1 mL/dk
Dalga boyu	250 nm
Kolon sıcaklığı	25 °C
Analiz süresi	6 dk

Fusidik asit ve sodyum fusidat için analitik yöntem validasyonu, ICH kılavuzuna göre yapılmıştır (254). Her iki etkin madde için geliştirilen HPLC yönteminin değerlendirilmesinde doğrusalılık, doğruluk, kesinlik (gün içi tekrarlanabilirlik ve günlerarası tekrarlanabilirlik), özgüllük, seçicilik, duyarlılık (miktar tayini sınırı (LOQ), saptama sınırı (LOD) ve stabilite parametreleri incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusalılığı, belli bir aralıkta numunedeki analiz edilen maddenin konsantrasyonu (miktarı) ile doğru orantılı olan analiz sonuçları elde etme yeteneğidir (254). Fusidik asitin ve sodyum fusidatın doğrusalılık çalışmaları için 10, 20, 25, 40, 50, 80 µg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Analiz sonucunda, konsantrasyona karşı elde edilen pik alanları kullanılarak doğru denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, konvansiyonel bir gerçek değer veya bir referans değer olarak kabul edilen değer ile bulunan değer arasındaki uyumluluğun yakınlığını ifade etmektedir (254). 10 µg/mL, 25 µg/mL ve 80 µg/mL konsantrasyonlarda fusidik asit ve sodyum fusidat standart çözeltileri hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Her konsantrasyon için geri kazanım yüzdesi Eşitlik 3.1.'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Hesaplanan konsantrasyon}}{\text{Teorik konsantrasyon}} \times 100 \quad (3.1.)$$

Kesinlik

Analitik bir yöntemin kesinliği, aynı homojen numunenin öngörülen koşullar altında çoklu örneklenmesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki yakınlığı ifade etmektedir. Yöntemin kesinliği genellikle bir dizi ölçümün standart sapması veya varyasyon katsayısı ile ifade edilmektedir (254). Yöntemin kesinliğini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (10 µg/mL, 25 µg/mL ve 40 µg/mL) hazırlanan fusidik asit ve sodyum fusidat standart çözeltilerde gün içinde ve günler arasında etkin maddeler analiz edilerek yöntemin tekrar edilebilirliği (repeatability) ve ara kesinliği (intermediate precision) değerlendirilmiştir.

Tekrarlanabilirlik

Yöntemin tekrarlanabilirliği veya gün içi tekrarlanabilirlik aynı konsantrasyondaki örnekler sıra ile 6 kez uygulanarak elde edilen pik alanlarının ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır.

Ara kesinlik

Ara kesinlik, laboratuvar için varyasyonları ifade etmektedir. Yöntemin ara kesinliği 10 µg/mL, 25 µg/mL ve 40 µg/mL konsantrasyondaki standart çözeltileri 3 gün ara ile ölçülerek elde edilen pik alanlarının ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır.

Jellerden Etkin Madde Ekstraksiyonu

Fusidik asit için, 0.5 mL jel formülasyonu balon jöjeye eklenip 10 mL'ye Asetonitril:Su:Asetik asit (70:29:1) çözücü karışımı ile tamamlanmıştır. 8500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek süpernatant çekilmiştir. Bu çözeltiden 0.05, 0.25 ve 0.8 mL alınır balon jöjeye eklenip 10 mL'ye Asetonitril:Su:Asetik asit (70:29:1) çözeltisi ile tamamlanmıştır. Standart çözeltilerin konsantrasyonunda 5, 25 ve 80 µg/mL çözeltiler elde edilmiştir. Çözelti 0.45 µm por çapına sahip PTFE filtrelerden

süzülerek viallere aktarıldıktan sonra HPLC yöntemiyle 250 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Tayin edilen etkin madde miktarından hareketle % geri kazanım hesaplanmıştır.

Sodyum fusidat için, formülasyonlardan 0.5 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış, 10 mL'ye Asetonitril:0.05 mol/L:metanol (10:4:1) karışımı ile tamamlanmıştır. 8500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek süpernatant çekildikten sonra 0.1, 0.25, 0.8 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve 10 mL'ye Asetonitril:0.05 mol/L:metanol (10:4:1) karışımı ile tamamlanmıştır. 0.45 µm PTFE filtrelerden geçirilerek viallere aktarıldıktan sonra HPLC yöntemiyle 235 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Tayin edilen etkin madde miktarından hareketle % geri kazanım hesaplanmıştır.

Özgüllük

Özgüllük, bir analitik yöntemin amaçlanan maddeyi spesifik olarak tayin edilebilmesi ve formülasyonlarda kullanılan aktif olmayan bileşenlerle (analitik plasebo) etkileşim olmadığı gösterilmesidir (254). Etkin madde içermeyen jeller plasebo çözeltisi olarak hazırlanmış ve geliştirilen metodun fusidik aside ve sodyum fusidata spesifik olduğu, formülasyonda yer alan yardımcı maddelerin fusidik asidin ve sodyum fusidatın pik verdiği noktada herhangi bir girişim oluşturmadığı gösterilmiştir.

Duyarlılık

i) Miktar Tayini Sınırı (Limit of Quantitation, LOQ)

Analizi yapılan maddenin uygun kesinlik ve doğruluk ile kantitatif olarak tayin edilebildiği en düşük madde konsantrasyonu (miktarı) olarak tanımlanmaktadır (254).

ii) Saptama Sınırı (Limit of Detection, LOD)

Analizi yapılan maddenin saptanabilen ancak kesin bir değer olarak miktar tayini gerektirmeyen en düşük madde konsantrasyonu (miktarı) olarak tanımlanmaktadır (254).

Yöntemin LOQ ve LOD'si, Eşitlik 3.2. ve 3.3.'te verilen denklem kullanılarak cihazın yanıtının (response) ve eğimin standart sapmasına dayalı olarak belirlenmiştir. Eğim, kalibrasyon eğrisinden elde edilmiştir.

$$LOD = 3.3 \times \frac{\sigma}{S} \quad (3.2.)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{S} \quad (3.3.)$$

σ : yanıtın standart sapması

S: kalibrasyon doğrusunun eğimi

Stabilite

Fusidik asitin ve sodyum fusidatın validasyon süresi boyunca mobil fazda ve salım ortamındaki stabilitesi, numunelerin 0, 3 ve 6. saatte yeniden analizi ve fusidik asit ve sodyum fusidatın geri kazanım yüzdesinin ölçülmesiyle araştırılmıştır.

3.3.2. Sodyum Fusidat Miktar Tayini ve Validasyonu

Sodyum fusidatın miktar tayini için çalışmalarında sabit faz olarak C18 kolon ve mobil faz olarak asetoneitril, 0.05 mol/L fosforik asit ve metanolden (10:4:1) oluşan karışımı kullanılmıştır (255). Sodyum fusidat analizi için kromatografik koşullar Tablo 3.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.2. Sodyum fusidat miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemi koşulları.

Mobil faz	Asetoneitril :0.05 mol/L fosforik asit: metanol (67 : 26 : 7)
Kolon	Waters C18 150x4.6 mm, 5 μ m
Enjeksiyon hacmi	20 μ L
Akış hızı	1 mL/dk
Dalga boyu	235 nm
Kolon sıcaklığı	25 °C
Analiz süresi	6 dk

Sodyum fusidat için geliştirilen yöntemin validasyonu Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Endolizin Miktar Tayini ve Validasyonu

Protein yapısına sahip endolizin için farklı yöntemlerle miktar tayini yapılabilmektedir. Kullanılan miktar tayini yöntemlerinin birbirine göre üstünlükleri ve sakıncaları bulunmaktadır. Çalışmalarımızda kullanılacak en uygun endolizin miktar tayin yönteminin belirlenmesi amacıyla bikononik asit (BCA) yöntemi (kolorimetrik), nanodrop yöntemi (spektrofotometrik) ve Qubit Analizi Yöntemi (fluorometrik) olmak üzere 3 farklı yöntem incelenmiş ve en hassas ölçümü yapan Qubit analiz yöntemi kullanılmaya karar verilmiştir. Endolizinin miktar tayini Qubit Protein Analiz Kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak üretici firma talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir (256).

Qubit reaktifi, Qubit tamponunda 1:200 oranında seyreltilerek Qubit çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Her standart ve numune için 200 µL çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm tüpler 2-3 saniye vortekslenip, oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir ve Qubit Fluorometer 4 cihazında konsantrasyonu ölçülmüştür. Saflaştırılarak elde edilen endolizinin Qubit Fluorometer 4 ile ölçülen konsantrasyonundan hareketle formülasyonlarda kullanılması gereken endolizin miktarı ayarlanmıştır.

3.4. Formülasyon Geliştirme

3.4.1. Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Çalışmalarımızda kitosan bazlı jel formülasyonlarının hazırlanmıştır. Kullanılan kitosanların özellikleri Tablo 3.3.'te özetlenmiştir. Kitosan jeller %2 ve %3 (a/h) konsantrasyonda, %2 (h/h) dilüe asetik asit içerisinde disperse edilerek hazırlanmıştır. Suda çözünen Protasan kitosan jel ise aynı konsantrasyonlarda suda hazırlanmıştır. Geliştirilen formülasyonların listesi Tablo 3.4.'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3. Kitosan özellikleri.

Kitosan	Kodu	Jel konsantrasyonu (% a/h)	Molekül Ağırlığı (MA)	Deasetilasyon derecesi (%)
Koyo Kitosan (Koyo Chemical)	gK2	2	235	85
	gK3	3		
Orta molekül ağırlıklı kitosan (Sigma Aldrich)	gM2	2	190 - 310	75-85
	gM3	3		
Yüksek molekül ağırlıklı kitosan (Sigma Aldrich)	gH2	2	310 - 375	>75
	gH3	3		
Protasan UP B 80/20 (Novamatrix)	gP2	2	125 – 400	80-89
	gP3	3		

Fusidik Asit İçeren Jel Formülasyonları

Fusidik asit içeren jel formülasyonları, %2 (a/h) konsantrasyonda fusidik asidin %2 (a/h) veya %3 (a/h) kitosan jellere eklenmesiyle hazırlanmıştır. Fusidik asidin suda çözünürlüğü oldukça düşüktür (0,00521 mg/mL) (257-259). Bu nedenle fusidik asidin çözünürlüğünü artırmak amacıyla sürfaktan eklenmesi gerekmiştir. Bu amaçla farklı sürfaktanlar incelenmiştir. Öncelikle farklı sürfaktanların (Span 20, Span 80, Tween 20, Tween 80) farklı konsantrasyonlarında (%2 ve %3 a/h) çözünürlük çalışması yapılmıştır. Sürfaktan konsantrasyonu seçimi topikal formülasyonlar için önerilen doğrultusunda yapılmıştır (260). Bu amaçla farklı yüzey aktif maddelerde (Tween 20, Tween 80, Span 20 ve Span 80) fusidik asidin (%2 ve %3 (a/h) konsantrasyonda) çözünürlüğü incelenmiştir. Çözünürlük çalışmaları için dengeye ulaşılan süre olarak 72 saat belirlenmiş ve $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$ 'de yatay çalkalayıcıda farklı 72 saat boyunca çalkalanmış yapılmıştır. Bu süre sonunda süzülerek alınan örneklerde etkin madde miktarı tayin edilmiştir. Fusidik asit için en yüksek çözünürlük %3 a/h konsantrasyonda Tween 80 ile elde edilmiştir. Bu doğrultuda formülasyonlara %3 konsantrasyonda Tween 80 eklenmiştir. Öncelikle %2 konsantrasyonda fusidik asit üzerine %3 konsantrasyonda Tween 80 ilave edilmiş bu karışımın %2 (a/h) veya %3 (a/h) kitosan jellere eklenmesiyle fusidik asit içeren jel formülasyonları hazırlanmıştır.

Sodyum Fusidat İçeren Jel Formülasyonları

Sodyum fusidat içeren jeller hazırlanırken, %2 (a/h) konsantrasyonda sodyum fusidatın %2 h/h asetik içinde hazırlanan %2 (a/h) veya %3 (a/h) konsantrasyonda kitosan jellere eklenmesiyle hazırlanmıştır.

Endolizin İçeren Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Endolizin (LysSA10) içeren kitosan jel formülasyonu, endolizinin düşük pH'da stabilitesinin azaldığının gösterilmiş olması nedeniyle (228), pH'sı 5.0 olan koyo kitosan jel içinde hazırlanmıştır. %3(a/h) konsantrasyonda kitosan jel içine 0,5 mg/mL konsantrasyonda endolizin eklenmiştir.

Endolizin ve Fusidik Asit İçeren Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Endolizin ve fusidik asit içeren jel formülasyonlarında endolizin konsantrasyonu 0,5 mg/mL, fusidik asit konsantrasyonu %2 (a/h) ve kitosan konsantrasyonu %3 (a/h) olarak belirlenmiştir. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel formülasyonu Bölüm 3.4.1'de bahsedildiği şekilde hazırlanmıştır. 0,5 mg/mL konsantrasyonda endolizin, fusidik asit içeren koyo kitosan jele) eklenerek endolizin ve fusidik asit içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + FA + gK3) hazırlanmıştır.

Endolizin ve Sodyum Fusidat İçeren Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Endolizin ve sodyum fusidat içeren jel formülasyonlarında endolizin konsantrasyonu 0,5 mg/mL, sodyum fusidat konsantrasyonu %2 (a/h) ve kitosan konsantrasyonu %3 (a/h) olarak belirlenmiştir. Sodyum içeren koyo kitosan jel formülasyonu Bölüm 3.4.1'de bahsedildiği şekilde hazırlanmıştır. 0,5 mg/mL konsantrasyonda endolizin, sodyum fusidat içeren koyo kitosan jele eklenerek endolizin ve fusidik asit içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + SF + gK3) hazırlanmıştır.

Tablo 3.4. Geliştirilen jel formülasyonları.

	FA (%)	SF (%)	LysSA10 (%)	Tween 80 (%)	Koyo Chi (%)	MMW Chi (%)	HMW Chi (%)	Protasan (%)
gK2	-	-	-	-	2	-	-	-
gK3	-	-	-	-	3	-	-	-
gM2	-	-	-	-	-	2	-	-
gM3	-	-	-	-	-	3	-	-
gH2	-	-	-	-	-	-	2	-
gH3	-	-	-	-	-	-	3	-
gP2	-	-	-	-	-	-	-	2
gP3	-	-	-	-	-	-	-	3
FA +gK2	2	-	-	3	2	-	-	-
FA+ gK3	2	-	-	3	3	-	-	-
FA+gM2	2	-	-	3	-	2	-	-
FA+gM3	2	-	-	3	-	3	-	-
FA+gH2	2	-	-	3	-	-	2	-
FA+gH3	2	-	-	3	-	-	3	-
FA+gP2	2	-	-	3	-	-	-	2
FA+gP3	2	-	-	3	-	-	-	3
SF +gK2	-	2	-	-	2	-	-	-
SF+ gK3	-	2	-	-	3	-	-	-
SF+gM2	-	2	-	-	-	2	-	-
SF+gM3	-	2	-	-	-	3	-	-
SF+gH2	-	2	-	-	-	-	2	-
SF+gH3	-	2	-	-	-	-	3	-
SF+gP2	-	2	-	-	-	-	-	2
SF+gP3	-	2	-	-	-	-	-	3
LysSA10 + gK3	-	-	0,05	-	-	3	-	-
LysSA10 + FA + gK3	2	-	0,05	-	-	3	-	-
LysSA10 + SF + gK3	-	2	0,05	-	-	3	-	-

3.5. Formülasyonların Karakterizasyonu

Geliştirilen tüm jel formülasyonların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırma için fusidik asit ve sodyum fusidat için piyasada mevcut ürünler kullanılmıştır. Bu amaçla %2 konsantrasyonda fusidik asit içeren ticari krem (Fucidin Krem®, Abdi İbrahim) ve %2 konsantrasyonda sodyum fusidat içeren ticari merhem (Fucidin Merhem®, Abdi İbrahim) kullanılmıştır. Fusidik asit içeren ticari krem formülasyonu butilhidroksianisol, setil alkol, gliserol, sıvı parafin, potasyum sorbat, polisorbitat 60, beyaz yumuşak parafin, hidroklorik asit, vitamin E asetat içermektedir (261). Sodyum fusidat içeren ticari merhem formülasyonu ise susuz lanolin, setil alkol, vazelin likit, vazelin flant, setil alkol vitamin E asetat içermektedir (262).

3.5.1. pH

Geliştirilen formülasyonlarının pH'sı pH strip (İsolab) kullanılarak ölçülmüştür.

3.5.2. Yüzey Özellikleri

Jellerin zeta potansiyeli Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) kullanılarak ölçülmüştür. Her bir formülasyon için ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır. Ölçümden önce jeller distile su ile 1:40 oranında seyreltme yapılmıştır.

3.5.3. Viskozite

Hazırlanan jel formülasyonunun akış özellikleri koni plak viskozimetresinde (Brookfield DV-2T Viscometer (Essex, UK)) 25 ± 0.2 °C'de, 1-100 rpm arasında, 2.4 mm çaplı koni spindle ile (CP-52) kullanılarak ölçülmüştür. Uygun kayma hızı jel formülasyonuna göre incelenmiş uygun tork aralığında (10-90) olacak şekilde ölçümler yapılmıştır. 0.5 mL'dir örnek hacmi kullanılmıştır. Her bir örnek için test 3 kez tekrarlanmıştır.

3.5.4. In Vitro Adezyon Çalışmaları

Jel formülasyonunun in vitro adezyon ölçümleri TA-XT Plus model tekstür analiz cihazında (TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK) yapılmıştır (Şekil 3.1.). Ölçümler 500 g yük hücresi (Şekil 3.2a.), çıkarılabilir alüminyum prob (Şekil 3.2b.) ve mukoadezyon rigi (Şekil 3.2c.) kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan mukoadezyon rigi birbirine geçebilen şeffaf görünümlü iki tabakadan oluşmaktadır. Önceden ıslatılmış membran (Dialysis Membranes, MWCO 12 – 14 kDa) iki tabaka arasına yerleştirilerek vidaları sıkıştırılır. Jel, birbirine geçen iki tabaka arasında bulunan membran üzerine yerleştirilir. Selüloz membran ile probun temas ettiği yüzey alanı 0.635 cm², kullanılan jel miktarı ise 0.15 mL'dir. Aletin probu 0.1 mm/sn hızla jel yüzeyine temas ettirilmiş ve jel ile membran 180 sn 0.2 N kuvvet uygulanarak temas halinde bekletilmiştir. Daha sonra probun 0.1 mm/sn hızla jel yüzeyinden uzaklaşması sağlanarak iki yüzeyi birbirinden ayırmak için gereken kuvvet ölçülmüştür. Her bir formülasyon için test 3 kez tekrarlanmıştır. TA-XT Plus model tekstür analiz cihazı kullanılarak Texture 4.0 Exponent™ yazılımı yardımı ile kuvvete karşı zaman eğrilerinin altında kalan alanlar elde edilmiş olup, adezyon işi (mJ/cm²) Eşitlik 3.4.'te verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

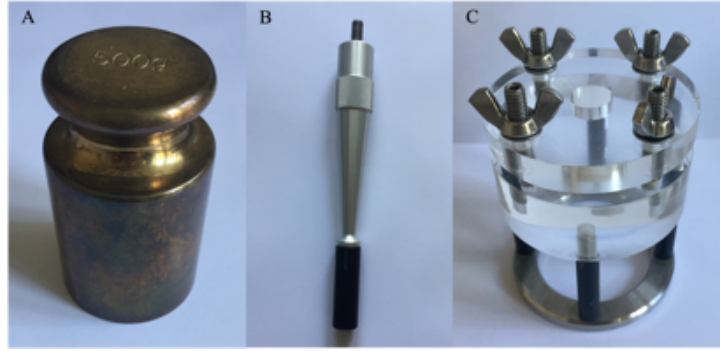
$$\text{Biyoadazyon işi (mJ/cm}^2\text{)} = \text{AUC}/\pi r^2 \quad (3.4.)$$

AUC = Eğri altında kalan alan A

πr^2 = Jel ile temas eden yüzey alanı ($r=0.635 \text{ cm}^2$)



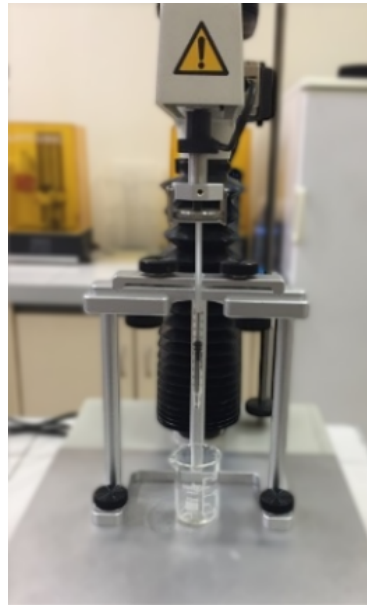
Şekil 3.1. TA-XT Plus model tekstür analiz cihazı.



Şekil 3.2. Tekstür analiz cihazında bulunan biyoadezyon ölçümü için kullanılan aparatlar a) yük hücresi, b) çıkarılabilir alüminyum prob, c) mukoadesyon rigi.

3.5.5. Şırınga Edilebilirlik

Şırınga edilebilirlik testi, geliştirilen jel formülasyonlarının deriye uygulanma kolaylığının saptanması amacıyla yapılmıştır. Bu parametre, bir formülasyonun uygulanması için gereken kuvveti gösterir ve pratik uygulamayı etkiler. Şırınga edilebilirlik tekstür analiz cihazı (TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK) ile ölçülmüştür (Şekil 3.3.). Jel formülasyonları 1 mL'lik plastik şırıngaya hava kabarcığı kalmayacak şekilde çekilip, şırıngalar dik bir şekilde cihaza kelepçelenerek ve prob 2 mm/sn hızla 3 cm'lik mesafeden sıkıştırma (compression) modunda indirilerek jelin şırıngadan dışarı itilmesi sağlanmıştır. Şırınga edilebilirlik işi, elde edilen kuvvet-zaman eğrisinde, eğri altında kalan alan hesaplanarak elde edilmiştir (263).



Şekil 3.3. Tekstür analiz cihazında şırınga edilebilirlik ölçümü düzeneği.

3.6. Formülasyonlar Üzerinde İn Vitro Çalışmalar

Formülasyonlarda in vitro olarak ilaç salım özellikleri, antimikrobiyal aktivite, hücre canlılığı incelenmiştir. Karşılaştırma amacıyla fusidik asit ve sodyum fusidat içeren ticari ürünler kullanılmıştır.

3.6.1. In Vitro Salım Çalışmaları

Jellerden etkin maddenin salımını test etmek için en uygun yöntemi belirlemek amacıyla Franz difüzyon hücresi ve diyaliz torbası yöntemleri denenmiş olup daha yüksek çözünürlük sonuçları elde edilmesi nedeniyle diyaliz torbası yöntemine karar verilmiştir.

Salım çalışmaları farklı pH'larda (5.0, 5.5 ve 7.4) yapılmıştır. Fusidik asidin suda çözünürlüğünün çok düşük olması nedeniyle salım ortamına farklı yüzey etkin maddeler (Tween 20 ve Tween 80) farklı konsantrasyonlarda (%0,5 ve %1 (a/h)) eklenerek çalışmalar yapılmış ve en yüksek çözünürlük sağlayan yüzey aktif madde olarak %1 (a/h) konsantrasyonda Tween 80 olduğu bulunmuştur. Salım çalışmaları %1 konsantrasyonda Tween 80 içeren pH 7.4 fosfat tamponu kullanılarak $33 \pm 0,5$ °C de sürdürülmüştür. Fusidik asitin (Mol. Ağ: 516,7) ve sodyum fusidatın (Mol Ağ: 538,7) molekül ağırlığı göz önünde bulundurularak salım çalışmalarında ilacın geçişine izin verecek şekilde 12000- 14 000 Da por açıklığına sahip diyaliz membranı kullanılmıştır. belirlenen zaman aralıklarında (5, 15 , 30 , 60 , 120 , 240 ve 360 dk) 0,5 mL örnek alınmış ve bu örnekler 0,45 µm por açıklığına sahip politetrafluoroetilen (PTFE) filtreden süzülerek HPLC'de tayin edilmiştir. Her bir deney için 6 tekrar yapılmıştır. Endolizinin molekül ağırlığı 66 kDa (LysSA10 için 53 kDa + SUMO füzyon proteini için 13 kDa = 66 kDa) olması sebebiyle 100 kDa por açıklığına sahip diyaliz membranlar kullanılmıştır. Belirli zaman aralıklarında (5, 15, 30, 60, 120, 240 ve 360 dk) 0,5 mL örnek alınmış ve etkin madde miktar tayini Qubit™ Protein Assay kitleri kullanılarak yapılmıştır.

Diyaliz torbasında kalan etkin madde miktarını belirlemek için 360 dakika sonunda diyaliz torbaları bağlandıkları noktalardan kesilerek salım ortamını içeren 50 mL'lik falkon tüplerine yerleştirilmiştir. 30 dakika bekletilmiş ve tüp karıştırıldıktan sonra 0,45 µm por açıklığına sahip politetrafluoroetilen (PTFE) filtreden süzülmüş ve

miktar tayini yapılmıştır. Salım çalışmaları geliştirilen tüm jel formülasyonları ve ticari ürünler için gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarımızda kullanılan membran ile etkin madde arasında etkileşim olmadığını göstermek amacıyla membran inertlik çalışması yapılmıştır. Fusidik asit ve sodyum fusidat için 12-14 kDa MWCO'a sahip, endolizin için 100 kDa MWCO'a sahip membranlar kullanılmıştır. Belirlenen konsantrasyonda ilaç (fusidik asit ve sodyum fusidat için 5 mg/mL ve endolizin için 500 µg/mL) ve membran (25 mm x 25 mm alana sahip) $32 \pm 0,5$ °C'de salım ortamında (fusidik asit ve sodyum fusidat için 20 mL, endolizin için 1 mL) 6 saat inkübe edilmiştir. Kontrol lolarak membran içermeyen ortamda bekletilen etkin madde çözülemleri de incelenmiştir. Başlangıç ve 6. Saatte miktar tayini yapılmış ve % geri kazanımı hesaplanmıştır.

3.6.2. Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları

Antibakteriyel aktivite çalışmalarında metisiline dirençli *S. aureus* suşları (ATCC 43300 ve MRSA4), metisiline duyarlı *S. aureus* standart suşları (ATCC 33862 ve ATCC 6538), klinik *S.aureus* suşları (TRSA 2, TRSA8, TRSA 32, TRSA 45), klinik *Staphylococcus haemolyticus* (TRSH1) ve *Staphylococcus epidermidis* (TRSE6) suşları kullanılmıştır (Tablo 3.5.). Klinik ve standart izolatlar (MRSA4, TRSA2, TRSA8, TRSA32, TRSA45, TRSH1 ve TRSE6) Kılıç ve ekibi tarafından temin edilmiştir. Klinik izolatlar hastaneden farklı kaynaklardan (yara, lezyon, trakeal aspirat, idrar) izole edilmiştir. Saf endolizinin (LysSA10) Stafilokok suşlarına karşı etkili olduğu daha önceki çalışmada gösterilmiştir (228). Antibakteriyel aktivite çalışmalarında kullanılacak uygun yöntemin belirlenebilmesi için Agar Difüzyon ve Sıvı (broth) mikrodilüsyon yöntemleri incelenmiş ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygun görülerek, çalışmalara bu yöntemle devam edilmiştir (264).

Tablo 3.5. Antibakteriyel aktivite çalışmalarında incelenen *Staphylococcus aureus* standart ve klinik izolatlar.

Kodu	Suş adı	Suş kaynağı
ATCC 43300	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach</i> (Metisiline dirençli)	Klinik izolat
ATCC 33862	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach</i> (Metisiline duyarlı)	Belirtilmemiş
ATCC 6538	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach</i> (Metisiline duyarlı)	Lezyon
MRSA4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Yara
TRSA2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Yara
TRSA8	<i>Staphylococcus aureus</i>	Trakeal aspirat
TRSA32	<i>Staphylococcus aureus</i>	Yara
TRSA45	<i>Staphylococcus aureus</i>	Yara
TRSH1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Kan
TRSE6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	İdrar

*MRSA: Metisiline Dirençli *S. aureus*, ATCC: American Type Culture Collection (Standart Suş)

Sıvı (Broth) Mikrodilüsyon

Etkin maddeler tek başına (fusidik asit, sodyum fusidat, endolizin), etkin madde içermeyen kitosan jeller, etkin madde içeren jel formülasyonları ve piyasa preparatlarının antibakteriyel aktivitesi sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (264).0.5 McFarland türbiditeye sahip bakteri süspansiyonları hazırlanmış ve son inokulum 5×10^5 CFU/mL (koloni oluşturan birim; KOB/ml) olacak şekilde katyon ayarlı Mueller Hinton Broth ile dilüe edilmiştir. 96 kuyucuklu steril U tabanlı mikropkların tüm kuyucuklarına 50 µl MHB (Mueller Hinton Broth) eklenmiştir. Mikropkların ilk kuyucuğuna aktivitesi incelenecek her bir örnekten 50 µL eklenmiş ve 24 seri dilüsyon yapılmış ve son kuyucuktan alınan 50 µl karışım ise dışarı atılmıştır. Her plağa besiyeri ve bakteri kontrol kuyucukları eklenmiştir. 37°C’de 18 saat inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Mikropklar 18 saatin sonunda görsel olarak okunarak minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir.

3.6.3. Hücre Canlılığı Çalışmaları

Fusidik asit, sodyum fusidat, endolizin çözeltileri ve endolizin + fusidik asit, endolizin + sodyum fusidat çözelti kombinasyonları ve fusidik asit, sodyum fusidat, endolizin , endolizin + fusidik asit veya endolizin + sodyum fusidat kombinasyonu içeren jel formülasyonlarının hücre canlılığı çalışmaları L929 fare fibroblast hücre hattında MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromür) tetrazolyum yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (263). L929 fare fibroblast hücreleri, T-25 flasklarda büyütülerek ve haftada üç kez 37°C'de, %5 CO₂ ve %100 bağıl nem atmosferinde alt kültürleri alınmış ve üçüncü pasajda hücreler tutulmuştur. Kültür ortamı olarak %10 (h/h) Föetal Bovin Serum ve %1 penisilin-streptomisin (antibiyotik) ilave edilmiş Dulbecco Modified Eagle Medium Ham's (DMEM) kullanılmıştır. Logaritmik fazdaki adheren hücreler, %0.05 tripsin ve %0.02 EDTA karışımı ile yapıştıkları yerden ayırarak ve 37°C'de 3 dakika süreyle inkübe edilmiştir ve bu hücre inokülasyonu için kullanılmıştır. Hücreler (2 x 10⁵ mL⁻¹), 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 50 µL olacak şekilde eklenmiştir. Plaklar, 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda formülasyonlar ve kontrol grupları plakalara her kuyucukta 50 µL olacak şekilde ilave edilmiş ve 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda her kuyucuğa 25 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL) eklenmiş ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. 4 saatin sonunda, formülasyonları içeren ortam ve kontrol grupları plaktan çıkarılmış ve formazan kristallerini homojenize etmek için her kuyucuğa 200 µl DMSO (steril) eklenmiştir. Canlı hücre miktarı Eşitlik 4.1.'de verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Etkin madde konsantrasyonları 6.25, 12.5 ve 25µg/mL olarak belirlenmiştir. Formülasyonlar hücre kültürü ortamı ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Her bir formülasyon n=5 çalışılmıştır.

$$\text{Canlı hücrelerin miktarı (\%)} = \frac{\text{Formülasyon eklenmiş kuyucukların OD'si}}{\text{Ortam içeren kuyucukların OD'si}} \times 100 \quad (4.1.)$$

*OD: *Optical Density*

3.6.4. Stabilite Çalışmaları

Geliştirilen formülasyonlarda stabilite çalışmaları, Uluslararası Harmonizasyon Konseyi (ICH) Q1A kılavuz'una uygun olarak 4°C, 25°C ve 40°C'de 3, 6, 12 aylık aralıklarda ölçümler gerçekleştirilmiştir. Her bir zaman noktasında jel formülasyonlarının pH'sı ve viskozitesi ölçülmüş ve in vitro adezyon özellikleri incelenmiştir.

3.7. In Vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmalarda ön çalışmalarla enfeksiyon modeli oluşturulduktan sonra formülasyonların incelenmesi çalışmalarına geçilmiştir. Çalışmalarımızda yara iyileşmesi çalışmalarında sıklıkla kullanılan subkutanöz yara enfeksiyonu modeli kullanılmıştır (265, 266). Deney hayvanı olarak da BALB/c dişi fareler kullanılmıştır. In vivo çalışmalarda kullanılacak olan bakterinin, Risk Grubu 2 zoonoz olması nedeniyle biyogüvenlik seviyesi en az 2 (BSL-2) olan laboratuvarlarda çalışması zorunluluğu bulunmaktadır. Bu doğrultuda çalışmalar Ankara Üniversitesi Viral Zoonozlar İleri Araştırma ve Tanı Laboratuvarında (AVZAL) da gerçekleştirilmiştir. Etik kurul onayı Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar No : 2023-7-61).

3.7.1. Ön Çalışmalar

Seçilen yara modelinin uygunluğunu ve koşullarının teyidi için ön çalışmalar yapılmıştır. Enfeksiyon oluşturmak için MRSA43300 ve MRSA4 suşları 1×10^8 CFU/mL konsantrasyonda (100 µL) kullanılmıştır.

Farede Enfeksiyon Oluşturulması

MRSA enfeksiyonunun oluşturulması için BALB/c farelerde subkutanöz enfeksiyon oluşturulmuştur. Fareler 3 gruba ayrılmıştır: 1. grup (n=6) MRSA 43300 (1×10^8 CFU/mL) ile; 2. grup (n=6) MRSA4 (1×10^8 CFU/mL) ile enfekte edilmiş, 3. gruba (sham) serum fizyolojik (n=2) uygulanmıştır (Tablo 3.6.). Bu iki suş arasından daha hızlı ve iyi bir enfeksiyon oluşturan suş (MRSA4) seçilerek çalışmalara belirlenen suş ile devam edilmiştir.

MRSA suşunun enfekte etmek için hazırlanması

Hayvanları enfekte etmeden 3 gün önce, MRSA suşunun üretimi ve alt kültürleri oluşturulmuştur. MRSA stok kültürden kanlı agar plaklarına ekilmiş ve 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılarak üremesi sağlanmıştır. İkinci bir pasaj daha yapılmıştır. Kanlı agar plağında hemoliz fenotipi (her koloninin etrafında temiz bir bölge) kontrol edilmiştir. Enfeksiyon günü, gece boyu inkübatörde kalan ATCC 43300 ve MRSA4'e ait bakteri kültürü 15 mL hacmindeki vidalı kapaklı tüpte 10 mL önceden ısıtılmış Triptik Soy Broth ile 4-5 koloni alınarak seyreltilmiştir. OD600 değeri 1-1.3'e ulaşana kadar 220 rpm'de çalkalayarak yaklaşık 3-3.5 saat 37°C'de inkübe edilmiştir 37°C'de 10 dakika boyunca 6000 rpm'de santrifüjlenerek MRSA toplanmıştır. Süpernatantı atılmıştır. Bakteri peleti 5 mL fosfat tamponlu salin (PBS) içinde yeniden süspande edilmiştir. 37°C'de 10 dakika boyunca 6000 rpm'de tekrar santrifüjlenerek MRSA toplanmıştır. Süpernatantı atılmıştır. Bakteri pelleti steril PBS içinde yeniden süspande edilmiştir. 600 nm dalga boyunda OD değeri 0,7 elde edilene kadar steril PBS ile seyreltilmiştir. ATCC 43300 ve MRSA 4 için bakteri inokulumları ependorflara 100 µL olacak şekilde alikotlanmıştır ve enjeksiyona hazır hale getirilmiştir. Eş zamanlı olarak elde edilen bakteri süspansiyonları 10¹'den 10⁷'e seri olarak PBS ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş bakteri süspansiyonu mannitol salt agar plakalarına 10 µL damlatılmıştır. Plaklar gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnokulumun hemolitik fenotipi gözlemlenmiş ve kaydedilmiştir. Plaktaki Koloni Oluşturan Birim (CFU) sayılmış ve kaydedilmiştir.

BALB/c farelerin deneye hazırlanması (enfeksiyondan günü)

Farelerin sırt bölgeleri tıraş edilmeden önce ketamin/ksilazin (100/10 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Cilt kısırtma yanıtları dikkate alınarak anestezi tamamlandıktan sonra 20-25 g farelerin sırt kısmında 3 x 4 cm²' lik bir alandaki tüyleri tıraş makinesiyle tıraş edilmiştir.

Subkütan MRSA enfeksiyonu (enfeksiyon günü ve enfeksiyondan 3 gün sonra)

Farenin sırtındaki tıraş edilen alana 100 µL serum fizyolojik (%0.9 sodyum klorür çözeltisi) 1 mL'lik enjektörle (26 G) subkütan enjekte edilmiştir. Enjeksiyon

sonrasında 7-8 saat aralıklarla hayvanlar gözlemlenmiştir. Her gün hayvanların ağırlığı takip edilmiştir. Hayvanların sırtındaki oluşan lezyonun boyutu ölçülmüş (Şekil 3.4.) ve lezyon alanının görünümü günlük olarak kaydedilmiştir. Bakteri inokulumundan sonraki 2 ve 3. günde enfeksiyon değerlendirilerek hayvanlar anestezi dozunun 4 katı olacak şekilde ketamin/ksilazin (400/100 mg) ile sakrifiye edilmiştir. Deri bir çift steril makasla çengellenmiş ve dikkatlice soyulmuştur. Lezyonun tamamı ve çevresindeki alanın yaklaşık 2 - 5 mm'si çıkarılmıştır. Her bir hayvana ait dokular farklı petri kaplarına alınmıştır.



Şekil 3.4. Lezyon boyutunun ölçümü (beyaz çizgi uzunluğu: U; kırmızı çizgi genişliği:G).

Tablo 3.6. Ön çalışma grupları.

	Gruplar	Kod	Hayvan sayısı	Bakteri/ Kontrol Uygulama Dozu	Uygulama Hacmi
1	Serum fizyolojik uygulaması (sham)	Serum fizyolojik	2	% 0,9 NaCl	100 µL
2	Enfekte (ATCC 43300)	MRSA43300	6	1 x 10 ⁸ CFU/mL	100 µL
3	Enfekte (MRSA4)	MRSA4	6	1 x 10 ⁸ CFU/mL	100 µL

Lezyon alanı

Her bir hayvanda oluşan lezyonun uzunluğu ve genişliği kompas yardımıyla ölçülmüş ve lezyon alanı Eşitlik 5.1. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$A = \pi (U/2) \times (G/2) \quad (5.1.)$$

A: Lezyon alanı (mm²)

U: Uzunluk (mm)

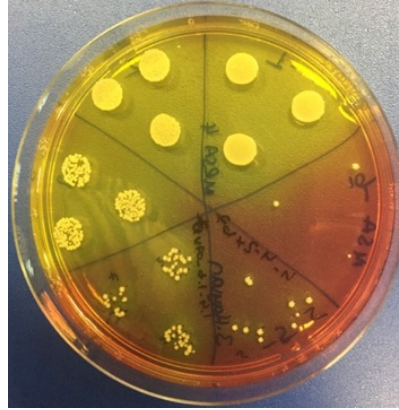
G: Genişlik (mm)

Her bir farenin sırtındaki lezyonların dijital görüntülemesi Canon Rebel T3i dijital fotoğraf makinesi ile gerçekleştirilmiştir.

Bakteriyel yük tayini

Bakteriyel yük tayini için her hayvanın lezyon boyutunun farklı olması sebebiyle $49,5 \pm 8$ mg (50 ± 8 mg) ağırlığında doku örnekleri kullanılmıştır. Deri örneklerinde bakteriyel yük tayini, deri homojenatının seri dilüsyonu yapıldıktan sonra Mannitol Salt Agar'a damlatılarak gerçekleştirilmiştir (267). Doku örneklerindeki *Staphylococcus aureus*, mannitol fermantasyonu sonucu oluşan asidik ürünle ortamdaki fenol kırmızısı mannitol salt agarda sarı renkte koloniler üretmektedir. Bu koloniler sayılarak bakteriyel tayini yapılmıştır (Şekil 3.5.).

500 µL PBS içeren 1.5 mL'lik ependorf tüplere doku tamamen PBS (150mM sodyum klorür, 10mM sodyum fosfat , pH 7.2) içinde kalacak şekilde yerleştirilmiş, ağzı sıkıca kapatılarak buz aküleri içerisinde örnekler 2 dk boyunca ultrasonik banyoda bekletilmiş ve dokulardaki bakterinin PBS'e geçmesi sağlanmıştır. 0,5 mm boyutundaki silika boncuklar doku içeren ependorflara eklenmiş ve vortekslenmiş 2 dk sonike edilmiş birkaç kez daha vortekslenerek ve dilüsyon yapılmıştır. Dokulara ait süspansiyon 10^1 ila 10^{10} PBS ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş süspansiyonlar Mannitol Salt Agar ve Kanlı Agar plakları üzerine 10 µL damlatılarak (n=3) ekilmiştir.



Şekil 3.5. Enfekte dokuda bakteriyel yük tayinine ait örnek. Hayvanlardan alınan doku örnekleri 10^{-1} 'den 10^{-6} 'ya kadar seri dilüsyonları ve mannitol salt agara ekimi sonucunda dilüsyona bağlı üremenin azaldığı görülmüştür.

Histopatolojik inceleme

Her bir farenin sırt bölgesindeki lezyonlardan doku örnekleri alınmıştır. Dişli penset yardımı ile farenin derisi kaldırılmış ve düz cerrahi makas kullanılarak lezyonun alt kısmındaki apselere dokunmadan ve farenin sırt tüylerini içermeyecek şekilde lezyon çevresinden kesilerek dikdörtgen şekilde örnek alınmıştır. Hayvanlardan alınan doku örneklerinin yarısı histopatolojik incelemeler için ayrılmıştır. Dokular ($\sim 1 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm}$) no 11 bistüri ucu ve 3 numaralı bistüri sapı ve dişsiz penset yardımıyla petri plakları içinde kesilmiş olup doku örneklerine uygun olarak kare şeklinde kesilmiş karton kağıtlara deri kırışmayacak şekilde toplu iğne ile (enfeksiyonun olduğu kısımlar hariç) tuturulmuş olup 20 mL % 4 konsantrasyonda formaldehit içeren uygun kaplara aktarılmıştır. Rutin fiksasyon, kesit ve hematoksilin ve eozin ile boyama sonrası deri örnekleri histopatolojik olarak incelenmiştir. Akut enflamasyonun değerlendirilmesi için ülserasyonun varlığı ve derecesi, bakteriler, nötrofiller, ödem ve konjesyon kaydedilirken, polimorfonükleer lökositlerin mononükleer enflamatuvar hücelere kayması ve vaskülaritenin derecesi kronik enflamasyonun değerlendirilmesi için puanlanmıştır. Onarım sürecini değerlendirmek için fibrozisin ve reepitelizasyonun şiddeti derecelendirilmiştir (268). Her morfolojik bulgu, 0 - 3 skoruna göre yarı kantitatif olarak derecelendirilmiştir (Tablo 3.7) (268). Nötrofillerin ve plazma ve monositik hücre yoksa skoru 0, az miktardaysa 1, orta derecede ise 2 ve çok miktardaysa 3 olarak belirlenmiştir. Akut enflamasyon

nötrofillerin varlığı, kronik enflamasyon ise plazma ve monositik hücrelerin varlığı olarak tanımlanmıştır.

İstatistiksel analizlerde nonparametrik test olan Kruskal-Wallis Varyans analizi kullanılmıştır.

Tablo 3.7. Histopatolojik skorlama.

	Skor			
	0	1	2	3
Akut enflamasyon	Yok	Az miktarda	Orta derecede	Çok miktarda
Kronik enflamasyon	Yok	Az miktarda	Orta derecede	Çok miktarda

Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Tayini

Yara enfeksiyonlarında, nötrofilik polimorfonükleer lökositler tarafından miyeloperoksidaz açığa çıkmaktadır. Çalışmamızda, deri örneklerinde MPO aktivitesi ölçülerek hem enfeksiyonun düzeyi hem de yaranın iyileşmesi belirlenmiştir (269). Bu amaçla ticari olarak temin edilen MPO aktivite analiz kiti kullanılmıştır. Deri örnekleri (~50 mg) 2 mL'lik kriotüplere alınarak ve doğrudan sıvı azotta dondurularak -80 °C'de saklanmıştır. Analiz aşamasında buz üzerinde dokular eritilerek her analiz için gerekli doku miktarı toplanmıştır. Tüm deri örnekleri (10 ± 3 mg) parçalanmış ve soğuk PBS'e sokup çıkarılarak yıkanmıştır. Doku hacminin yaklaşık 4 katı hacimde (100 µL) MPO tayin tamponunda homojenleştirilmiş ve yeniden süspende edilmiştir. Herhangi bir çözünmeyen materyali uzaklaştırmak için numune 13.000 g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant toplanarak temiz bir tüpe aktarılmıştır. Buz üzerinde tutulmuştur. Her bir örnek için 40 µL MPO analiz tamponu ve 10 µL MPO substratı karıştırılarak reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Background kontrol karışımı için ise 40 µL MPO analiz tamponu ve 10 µL su karıştırılmıştır. 96 kuyucuklu plağın pozitif kontrol ve numune içeren kuyucuklara 50 µL reaksiyon karışımı eklenmiştir. Background kontrol gruplarına background kontrol karışımı eklenmiştir. 25°C de 2 saat inkübe edilmiştir. 2 µL durdurma karışımı (stop mix) tüm kuyucuklara eklenip, karıştırılmış ve 10 dk inkübe edilmiştir. Her kuyucuğa 50 µL TNB/standart eklenmiştir, standart kuyucuklarına 0, 10, 20, 30, 40, 50 µL TNB/standart eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. OD412 nm'de mikropate reader ile ölçüm yapılmış ve MPO aktivitesi hesaplanmıştır.

Sitokin düzeylerinin tayini

Enflamasyon yanıtının değerlendirilmesi amacıyla derideki IL-1 β , IL-6, TNF- α ve IL-17A düzeyleri akış sitometresi (CytoFLEX, Beckman) ile tayin edilmiştir (270-272). Doku örneklerindeki sitokin düzeylerini aynı anda analiz edebilmek için farklı renkte işaretli anti mouse antikorlar ve izotip kontrol antikorlar kullanılmıştır. IL-6 için APC işaretli anti-mouse antikor ve APC- IgG1, κ izotip kontrol antikor kullanılmıştır. TNF α için FITC işaretli-anti mouse antikor ve FITC - IgG1, κ izotip kontrol antikor, IL17A için PE işaretli anti-mouse antikor ve PE - IgG1, κ izotip kontrol antikor ve IL1 β için PerCP işaretli anti mouse antikor ve PerCP - IgG izotip kontrol antikor kullanılmıştır. Analiz öncesinde örnekler (~50 mg) tek tek çözüldürülmüş ve petri kabı üzerine alınarak üzerine bir miktar PBS damlatılmış (dokunun kurumaması için) sonrasında doku üzerine 3 mL Tripsin-EDTA (%0.05 tripsin ve %0.02 EDTA) eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 70 μ m açıklığında cell strainer (70 μ m) eklenmiş ve 50 mL falkon tüplere süzölmüştür. Petri plağındaki deri örnekleri PBS ile iyice yıkanarak süzölmüştür. Süzöntü 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Bir miktar PBS eklenerek polistiren flow tüplerine alınmış ve akış sitometresinde okuma yapılmıştır. Akış sitometrisi için intraselüler boyama protokolü uygulanmıştır (273). Permeabilizasyon ve fiksasyon için permeabilizasyon ve fiksasyon kiti kullanılmıştır. Çalışmalarda uygulanan tek hücre süspansiyonu oluşturma yöntemini optimize etmek için sağlıklı doku örnekleriyle çalışılmış ve hücrelere boyanmadan akış sitometresinde analiz edilmiştir. Elde edilen hücre sayısı kontrol edilmiş ve yöntem optimize edilerek çalışma gruplarına ait dokularda da aynı yöntem kullanılmıştır.

3.7.2. Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi

İn vivo çalışmalarda ön çalışmalarla enfeksiyon modeli oluşturulduktan sonra formülasyonların incelenmesi çalışmalarına geçilmiştir. Formülasyonların etkinliğinin in vivo değerlendirmesi için MRSA4 suşuna karşı subkutanöz enjeksiyonla deneysel olarak enfeksiyon oluşturulmuş BALB/c farelerde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

MRSA Suşunun Enfeksiyona Hazırlanması

MRSA suşunun üretimi ve alt kültürleri enfeksiyondan üç gün önce oluşturulmuştur. MRSA4 stok kültürden kanlı agar plaklarına ekilmiş ve 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakılarak üremesi sağlanmıştır. İkinci bir pasaj daha yapılmıştır. Kanlı agar plağında hemoliz fenotipi (her koloninin etrafında temiz bir bölge) kontrol edilmiştir.

MRSA'nın enfeksiyona hazırlanması (enfeksiyon günü)

MRSA4’e ait bakteri kültürleri ön çalışmalarda anlatıldığı şekilde (Bölüm 3.7.1) gerçekleştirilmiştir.

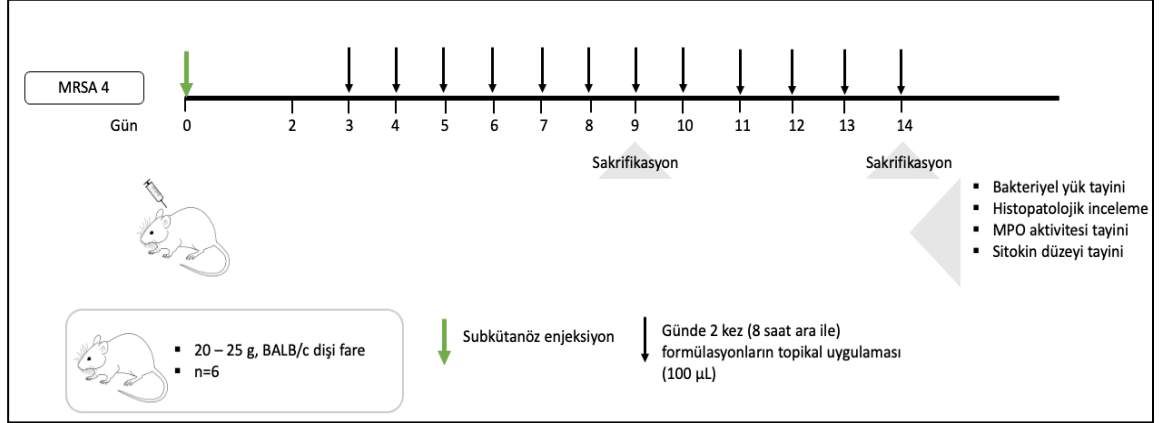
BALB/c farelerin enfeksiyona hazırlanması (enfeksiyon günü)

Farelerin sırt bölgeleri tıraş edilmeden önce ketamin / ksilazin (100/10 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Cilt kısırtma yanıtları dikkate alınarak anestezi tamamlandıktan sonra 20 – 25 g farelerin sırt kısmında 3 x 4 cm²’ lik bir alandaki tüyleri tıraş makinesi yardımıyla tıraş edilmiştir.

Subkütanöz MRSA Enfeksiyonu

Ön çalışmalarda ve formülasyon uygulanması için gerçekleştirilen çalışma protokolü Şekil 3.6.’da özetlenmiştir. Farenin sırtında tıraş edilen alana subkütanöz enjeksiyonla 100 µL bakteri süspansiyonu enjekte edilmiştir. Sağlıklı farelere tıraş edilen alana 100 µL serum fizyolojik subkütan olarak enjekte edilmiştir. Hayvanların ağırlığı, sırtındaki lezyonların boyutu ve lezyon alanının görünümü günlük olarak kaydedilmiştir. Deri lezyonun uzunluğu ve genişliği çarpılarak ölçülmüştür. Bakteri inokulumundan sonraki 3. günden sonra enfeksiyon değerlendirilerek 8 saat ara ile günde 2 kez (saat 08.00 ve 16.00) formülasyonlar ve kontrol grupları uygulaması yapılmıştır (Tablo 3.8.). Çalışma gruplarındaki fareler lezyon alanlarındaki iyileşme göz önünde bulundurularak formülasyon uygulama başladıktan 6. gün (Gün 9) veya 11 gün sonra (Gün 14) anestezi dozunun 4 katı olacak şekilde ketamin/ksilazin (400/100 mg) ile sakrifiye edilmiştir. Deri bir çift steril makasla çengellenerek ve dikkatlice soyulmuştur. Lezyonun tamamı ve çevresindeki alanın yaklaşık 2-5 mm'si

çıkarılmıştır. Her bir hayvana ait dokular farklı petri kaplarına alınmıştır. Alınan deri örneklerinin yarısı lezyonun tam ortasında kesilerek histopatolojik inceleme için ayrılmıştır. Geri kalan yarısı eşit parçalarda üçe bölünerek bakteriyel yük, miyeloperoksidaz aktivitesi ve sitokin analizleri için ayrılmıştır.



Şekil 3.6. In vivo çalışma protokolü.

Tablo 3.8. Çalışma grupları.

	Hayvan Grubu	Kod	Uygulama hacmi
1	Enfekte	Negatif Kontrol	% 0,9 NaCl 200 µl/gün
2	Enfekte	Pozitif kontrol	-
3	Fusidik asit (%2 a/a) içeren ticari ürün (Fucidin krem)	Ticari (FA)	200 µL/gün
4	Sodyum fusidat içeren ticari ürün (Fucidin merhem)	Ticari (SF)	200 µL/gün
5	Fusidik asit çözeltisi (%2 a/h etanolde)	FAsol	200 µL/gün
6	Sodyum fusidat çözeltisi (%2 a/h suda)	SFsol	200 µL/gün
7	Endolizin çözeltisi	LysSA10	200 µL/gün
8	Kitosan jel (gK3)	gK3	200 µL/gün
9	Kitosan jel (gM3)	gM3	200 µL/gün
10	Fusidik asit + kitosan jel (baz kitosan)	FA+gK3	200 µL/gün
11	Fusidik asit + kitosan jel (orta molekül ağırlıklı kitosan)	FA+gM3	200 µL/gün
12	Sodyum fusidat + kitosan jel (baz kitosan)	SF + gK3	200 µL/gün
13	Sodyum fusidat + kitosan jel (orta molekül ağırlıklı kitosan)	SF + gM3	200 µL/gün
14	Endolizin + kitosan jel (baz kitosan)	LysSA10 + gK3	200 µL/gün
15	Endolizin + Fusidik asit + kitosan jel (baz kitosan)	LysSA10 + FA + gK3	200 µL/gün
16	Endolizin + Sodyum fusidat + kitosan jel (baz kitosan)	LysSA10 + SF + gK3	200 µL/gün

Çalışma boyunca her bir hayvanın ağırlığı, lezyon alanı ve lezyon görüntüleri günde 2 kez olacak şekilde kaydedilmiştir. Lezyon alanı, lezyon alanı görüntülemesi, bakteriyel yük tayini, histopatolojik inceleme ve MPO aktivitesi tayini ön çalışmalarda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analizler

Tüm analizler Prism version 7 kullanılarak tek yönlü ANOVA analizi ile değerlendirilmiştir. Histopatolojik skorlamaların istatistiksel değerlendirmesinde non-parametrik test olan Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

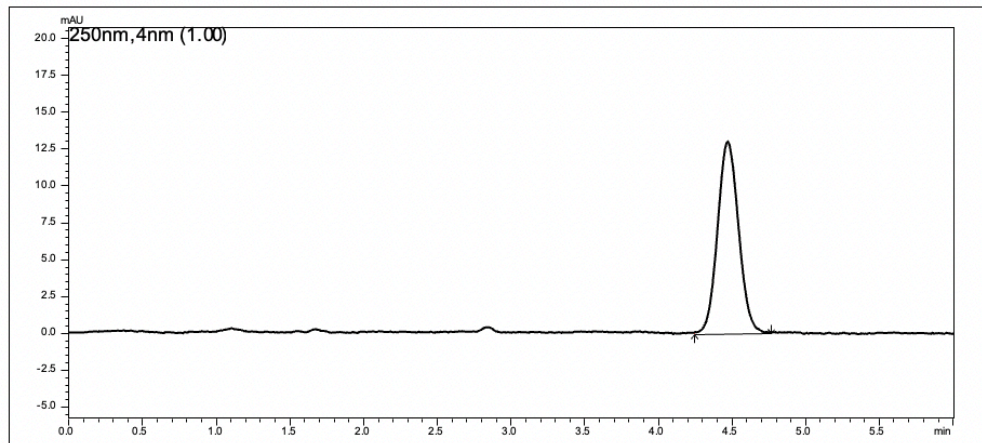
4. BULGULAR

4.1. Fusidik Asit ve Sodyum Fusidat Miktar Tayini ve Validasyonu

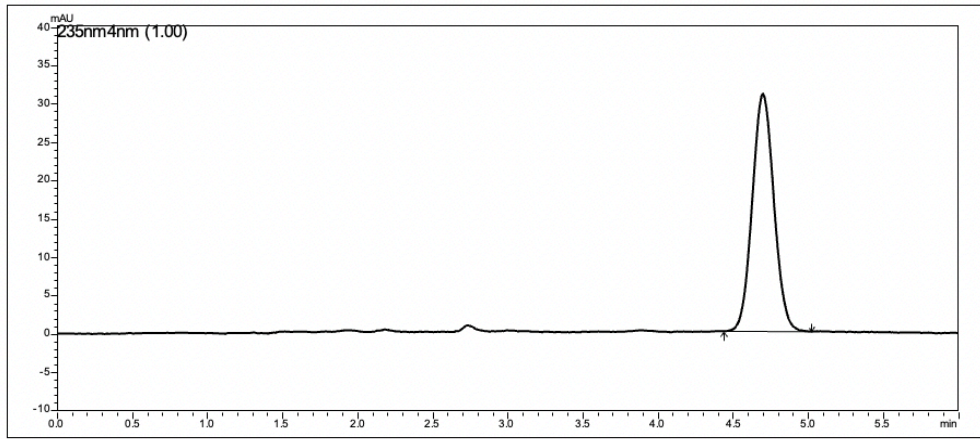
Fusidik asit ve sodyum fusidat HPLC ile miktar tayini Tablo 4.1.'de verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Fusidik aside ait HPLC kromatogramı Şekil 4.1.'de, sodyum fusidata ait kromatogram Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Fusidik asidin ve Sodyum Fusidatın HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.

Etkin Madde	Fusidik Asit	Sodyum Fusidat
Mobil faz	Asetonitril:su:asetik asit (79:29:1)	Asetonitril :0.05 mol/L fosforik asit: metanol (67 : 26 : 7)
Kolon	Waters C18 150x4.6 mm, 5 µm	Waters C18 150x4.6 mm, 5 µm
Enjeksiyon hacmi	20 µL	20 µL
Akış hızı	1 mL/dk	1 mL/dk
Dalga boyu	250 nm	235 nm
Kolon sıcaklığı	25 °C	25 °C
Retansiyon zamanı	4,5 dk	4,9dk



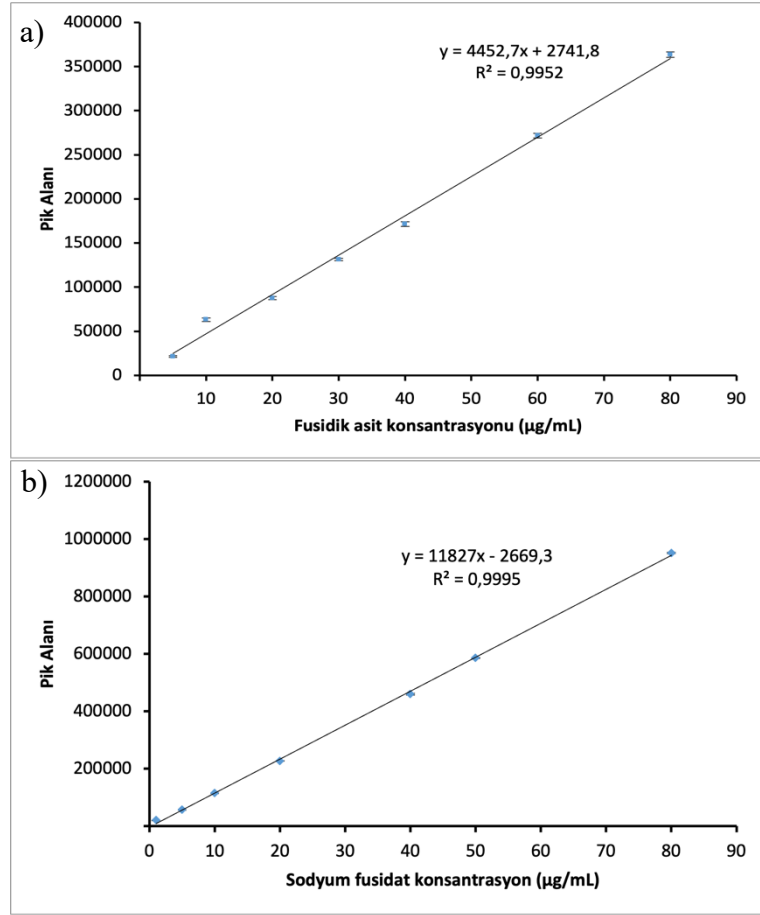
Şekil 4.1. Fusidik asidin HPLC kromatogramı (mobil faz içerisinde).



Şekil 4.2. Sodyum fusidatın HPLC kromatogramı (mobil faz içerisinde).

Doğrusallık

Fusidik asidin ve sodyum fusidatın doğrusallık tayini için 10, 20, 25, 40, 50, 80 µg/mL olmak üzere 6 konsantrasyonda mobil faz içerisinde fusidik asidin verdiği piklerin eğri altında kalan alanlar belirlenmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve denklemleri Şekil 4.3.'te yer almaktadır. Fusidik asidin ve sodyum fusidatın tanımlayıcılık katsayısı olan R^2 değerleri sırasıyla 0,9952 ve 0,9995 olarak bulunmuş ve yöntemin doğrusallığı gösterilmiştir. R^2 'nin 1'e yakın olması, deneysel sonuçların yüksek güvenilirlikte olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3. Fusidik asidin (a) ve sodyum fusidatın (b) doğrusallık çalışması sonucunda elde edilen kalibrasyon doğrusu (n=6) (mobil faz içerisinde).

Doğruluk

Geliştirilen analitik metodun doğruluğunu göstermek amacıyla fusidik asidin ve sodyum fusidatın düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda kalibrasyon sınırları içerisinde olmak üzere 10 µg/mL, 25 µg/mL ve 80 µg/mL 3 farklı konsantrasyonda standart çözeltisi mobil faz içerisinde hazırlanarak ölçüm yapılmıştır. Ölçümle bulunan konsantrasyonlardan fusidik asidin % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.2.). Varyasyon katsayısı (%RSD) değerleri %2'nin altında bulunmuş, yöntemin doğruluğu gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Fusidik asidin ve sodyum fusidatın analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk sonuçları (n=6).

Etkin madde	Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Hesaplanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) \pm SS	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
Fusidik asit	10	10,02 \pm 0,14	100,2	1,35
	25	25,05 \pm 0,13	100,2	0,5
	80	79,7 \pm 0,2	99,6	0,3
Sodyum fusidat	10	9,96 \pm 0,06	99,6	0,57
	25	25 \pm 0,05	99,9	0,2
	80	79,38 \pm 0,14	99,2	0,18

Kesinlik

Tekrarlanabilirlik

Yöntemin tekrarlanabilirliği için fusidik asidin ve sodyum fusidatın 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ ve 80 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin gün içinde 6 kez uygulanarak elde edilen pik alanı değerleri hesaplanmış ve varyasyon katsayısı (%RSD) değerleri değerlendirilmiştir (Tablo 4.3.). Varyasyon katsayısı (%RSD) değerleri %2'nin altında bulunmuş, yöntemin tekrarlanabilirliği gösterilmiştir.

Ara kesinlik

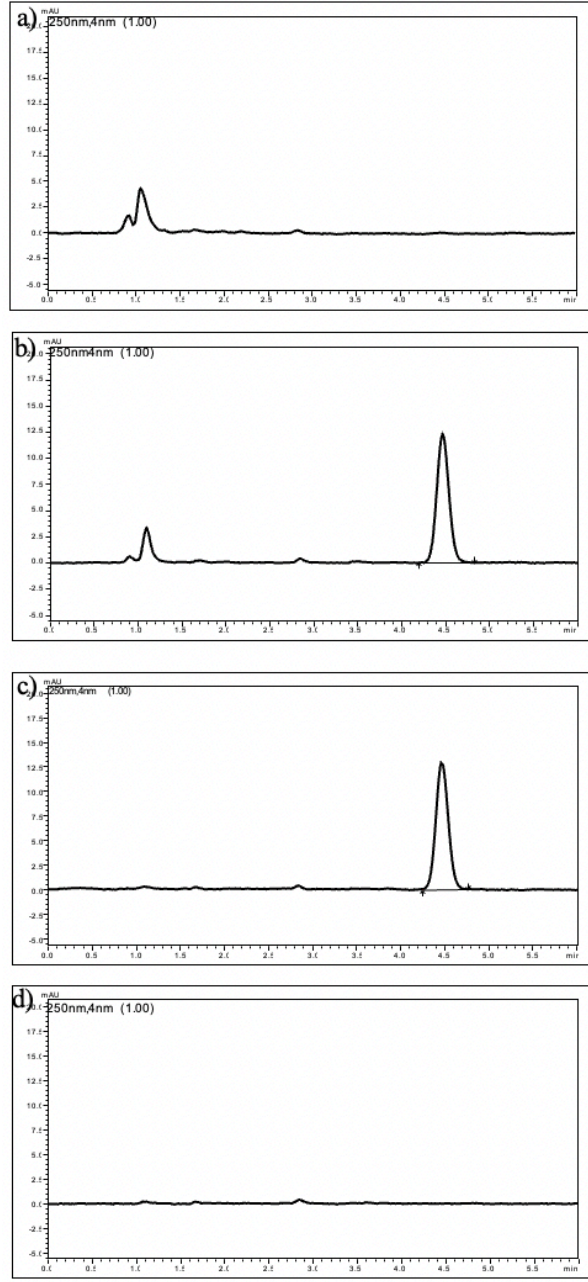
Yöntemin ara kesinliği 10 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ ve 80 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki mobil faz içerisinde hazırlanan standart çözeltilerinde 3 gün ard arada ölçüm yapılarak varyasyon katsayısı (%RSD) hesaplanmıştır (Tablo 4.3.). %RSD değerleri %2'nin altında bulunmuş, yöntemin ara kesinliği gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Fusidik asidin ve sodyum fusidatın analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik sonuçları (n=6).

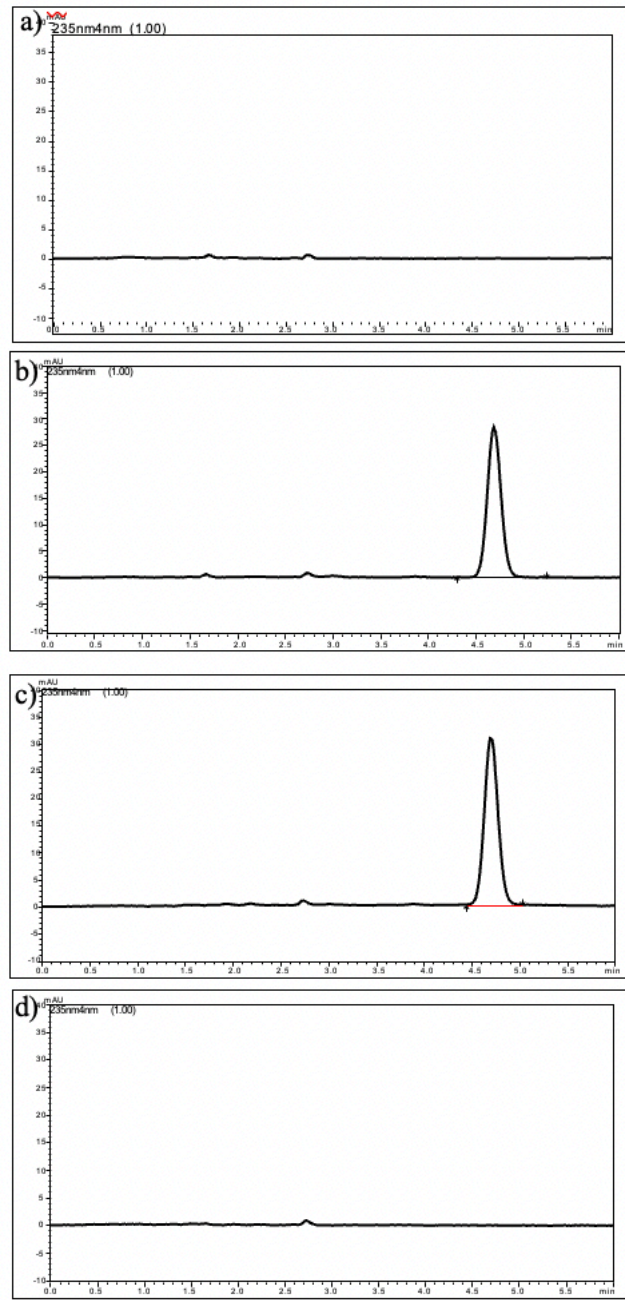
Etkin Madde	Teorik Kons. ($\mu\text{g/mL}$)	Tekrarlanabilirlik (Gün içi)			Ara Kesinlik (Günler arası)		
		Hesaplanan Kons. ($\mu\text{g/mL}$) \pm SS	Geri Kazanım (%)	RSD (%)	Hesaplanan Kons. ($\mu\text{g/mL}$) \pm SS	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
Fusidik asit	10	9,96 \pm 0,05	99,64	0,45	9,95 \pm 0,05	99,51	0,65
	25	25,24 \pm 0,1	100,96	0,4	25,3 \pm 0,08	101,13	0,3
	80	80,72 \pm 0,12	100,90	0,15	80,5 \pm 0,3	100,58	0,4
Sodyum fusidat	10	9,96 \pm 0,02	99,6	0,18	9,90 \pm 0,05	99,1	0,48
	25	25,01 \pm 0,02	100,05	0,08	24,9 \pm 0,1	99,9	0,49
	80	79,70 \pm 0,08	99,59	0,1	79,8 \pm 0,03	99,7	0,04

Özgüllük

Etkin madde içermeyen jellerin 250 nm ve 235 nm dalga boyunda fusidik asidin ve sodyum fusidatın oluşturduğu pik alanlarında girişim yapmadığı görülmüş ve yöntemlerin özgül olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.).



Şekil 4.4. Fusidik aside ait özgüllük sonuçları a) placebo çözeltisi, b) formülasyon (25 µg/mL), c) standart çözelti (25 µg/mL), d) mobil faz.



Şekil 4.5. Sodyum fusidata ait özgülük sonuçları a) placebo çözeltisi, b) formülasyon (25 µg/mL), c) standart çözelti (25 µg/mL), d) mobil faz.

Duyarlılık (LOQ ve LOD)

Duyarlılık kalibrasyon denklemi kullanılarak tespit edilmiştir. Bunun için fusidik asit çözeltisinin cihaz yanıtı 2840,1 ve sodyum fusidat çözeltisine ati cihaz yanıtı 4640,9 elde edilmiştir. Eşitlik 1 ve 2 kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda fusidik asit miktar tayini sınırı (LOQ) 5,47 µg/mL, saptama sınırı (LOD)

1,8 µg/mL olarak bulunmuştur. Sodyum fusidat miktar tayini sınırı (LOQ) 3,77 µg/mL, saptama sınırı (LOD) 1,25 µg/mL olarak bulunmuştur.

Stabilite

Hazırlanan fusidik asit ve sodyum fusidatın mobil faz içerisinde çözeltisinin stabilite sonuçları Tablo 4.4.'te gösterilmektedir. Sonuçlar göre fusidik asidin ve sodyum fusidatın analiz süresi boyunca stabil kaldığını göstermektedir.

Tablo 4.4. Fusidik asidin ve sodyum fusidatın mobil faz içerisinde stabilitesine ilişkin bulgular (n=6).

Etkin Madde	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman (sa)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
Fusidik asit	25	0	25,3	101,36	0,25
	25	3	25,14	100,58	0,5
	25	6	25,13	100,5	0,24
Sodyum fusidat	25	0	25,3	101,2	0,38
	25	3	25,28	101,1	0,6
	25	6	25,25	101	0,5

Hazırlanan fusidik asit ve sodyum fusidatın salım ortamındaki (%1 Tween 80 içeren pH 7.4 tamponu) stabilite sonuçları Tablo 4.5.'te gösterilmiştir. Fusidik asit ve sodyum fusidat salım ortamında stabil kaldığı gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Fusidik asidin ve sodyum fusidatın salım ortamı içerisinde stabilitesine ait bulgular (n=6).

Etkin Madde	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman (sa)	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
Fusidik asit	50	0	50,81	98,59	1,5
	50	3	48,93	98,71	1,15
	50	6	47,86	98,24	1,25
Sodyum fusidat	50	0	50,28	100,56	0,45
	50	3	50,76	101,52	0,91
	50	6	51,22	102,43	0,65

Fusidik asit ve sodyum fusidatın jellerden ekstraksiyonu

Jellerden etkin maddenin miktar tayini için fusidik asit asetonitril:su:asetik asit (79:29:1) çözücü karışımı, sodyum fusidat ise asetonitril:0.05 mol/L:metanol (10:4:1) çözücü karışımı kullanılarak formülasyonlardan ekstrakte edilmiş ve miktar tayin gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.6.'da sunulmuştur. Fusidik asit ve sodyum fusidat jellerden etkin madde miktar tayininde >%93 oranında geri kazanım elde edilmiştir. Jellerden ekstraksiyon sonucu elde edilen etkin maddeye ait kromotogramlar Şekil 4.4b. ve Şekil 4.5b.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Fusidik asidin ve sodyum fusidatın jellerden ekstraksiyon sonrası geri kazanıma ait sonuçlar (n=6).

Etkin madde	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)±SS	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
Fusidik asit	10	9,69±0,08	96,89	0,83
	25	24,11±0,11	96,45	0,44
	80	77,99± 0,1	97,49	0,13
Sodyum fusidat	10	9,96±0,04	99,61	0,38
	25	23,75±0,09	95,0	0,4
	80	74,48±0,05	93,1	0,07

4.2. Endolizin (LysSA10) Miktar Tayini ve Validasyonu

Endolizin konsantrasyonunun tayini için üç farklı yöntem incelenmiş olup elde edilen sonuçlar Tablo 4.7.'de özetlenmiştir. En yüksek konsantrasyon 73,25 mg/mL ile spektrofotometrik yöntem olan Nanodrop kullanılarak elde edilmiştir. Endolizinin etkinliğini saf olan kısmından gösterdiği için ölçüm yöntemleri arasında dışardan gelebilecek kontaminantlardan en az etkilenen ölçüm Qubit Analizi yöntemi olarak bulunmuştur (274). Bu nedenle endolizin miktar tayini çalışmalarında Qubit analizi yöntemi kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.7. Endolizinin miktar tayini için yöntemlerin karşılaştırılması.

Yöntem	Endolizin konsantrasyonu (mg/mL)
BCA Analizi*	22,86
Nanodrop**	73,25
Qubit Analizi***	0,816

* endolizin çözeltisi BCA çalışma reaktifi içerisinde hazırlanmıştır. ** endolizin PBS içerisinde çözeltisinin doğrudan ölçümü yapılmıştır. *** endolizin çözeltisi Qubit çalışma çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır.

4.3. Formülasyon Geliştirme ve Karakterizasyon

Jel formülasyonları hazırlanırken farklı konsantrasyonlarda (%2 ve %3 a/h), farklı molekül ağırlığı ve farklı deasetilasyon derecesine sahip farklı özelliklerde kitosanlar kullanılmıştır. Berrak görünüme ve homojen bir yapıya sahip kitosan jeller hazırlanmıştır (gK2, gK3, gM2, gM3, gH2, gH3, gP2, gP3). Fusidik asit içeren jel formülasyonlarına eklenecek sürfaktanın ve konsantrasyonunun belirlenmesi için farklı sürfaktanlarla yapılan çözünürlük çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 4.8.'de özetlenmiştir. En yüksek çözünürlük sağlayan %3 konsantrasyonda Tween 80 formülasyona eklenmiştir.

Tablo 4.8. Fusidik asit için farklı sürfaktanlarla yapılan çözünürlük çalışması sonuçları (n=3).

Sürfaktan	Çözünürlük (mg/mL) \pm SS	
	Sürfaktan Konsantrasyonu %2 (a/h)	Sürfaktan Konsantrasyonu %3 (a/h)
Span 20	8.55 \pm 0.24	8.97 \pm 0.07
Span 80	11,00 \pm 0.13	12.08 \pm 0.09
Tween 20	10.02 \pm 0.05	16.45 \pm 0.04
Tween 80	12.38 \pm 0.11	17.29 \pm 0.18


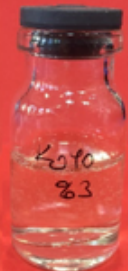

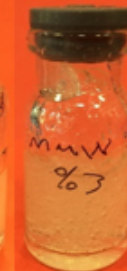
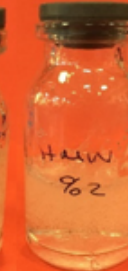
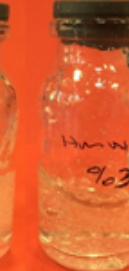
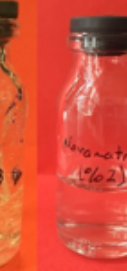

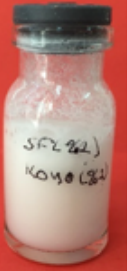

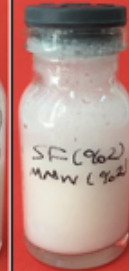
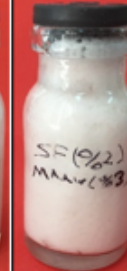
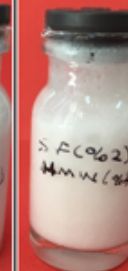




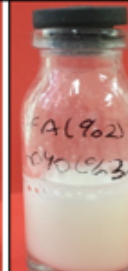

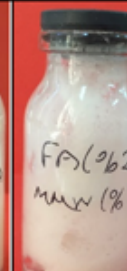
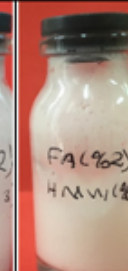
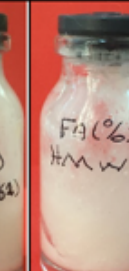

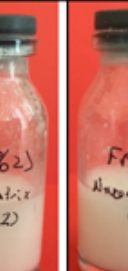



Kitosan jeller sodyum fusidat veya fusidik asit ile inkorpore edildiğinde jel formülasyonları beyaz ve opak görünümde olmuştur (Şekil 4.6.).

Endolizin içeren jel formülasyonları hazırlanırken %3 a/h konsantrasyonda 235 kDa molekül ağırlığına ve %85 deasetilasyon derecesine sahip özelliklerde koyo kitosan kullanılmıştır. Hafif sarı renkte homojen bir jel elde edilmiştir (Şekil 4.6.).

Endolizin + fusidik asit birlikte içeren ve endolizin + sodyum fusidat birlikte içeren jeller ise beyaz renkte homojen ve opak görünüştedir (Şekil 4.6).

4.3.1. pH

Koyo kitosan jeller (gK2 ve gK3) ve protosan jellerin (gP2 ve gP3) pH'sı 5.0 olarak bulunmuştur. Jellere fusidik asit veya sodyum fusidat eklenmesiyle pH'da değişiklik olmamıştır. Orta molekül ağırlıklı ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan jellerin (gM2, gM3, gH2, gH3) pH'sı 4.0 olup, etkin madde eklenmesiyle pH'da değişiklik olmamıştır (Tablo 4.9.). %3 konsantrasyonda Koyo kitosan jel (gK3) içinde hazırlanan endolizin (LysSA10 + gK3), endolizin+fusidik asit (LysSA10 + FA + gK3) ve endolizin+sodyum fusidat (LysSA10 + SF + gK3) içeren formülasyonların pH değeri 5.5 olarak bulunmuştur. Etkin madde ilavesinin jelin pHsını arttırdığı görülmüştür. Karşılaştırma amacıyla incelenen ticari ürünlerinin pHsı ise 4 olarak bulunmuştur (Tablo 4.9.).

Boş kitosan jeller							
gK2	gK3	gM2	gM3	gH2	gH3	gP2	gP3
							
Sodyum fusidat içeren							
SF + gK2	SF + gK3	SF + gM2	SF + gM3	SF + gH2	SF + gH3	SF + gP2	SF + gP3
							
Fusidik asit içeren							
FA + gK2	FA + gK3	FA + gM2	FA + gM3	FA + gH2	FA + gH3	FA + gP2	FA + gP3
							
Endolizin içeren		Endolizin + Fusidik asit içeren			Endolizin + Sodyum fusidat içeren		
LysSA10 + gK3		LysSA10 + FA + gK3			LysSA10 + SF + gK3		
							

Şekil 4.6. Geliştirilen jel formülasyonlarının makroskobik görünüşleri.

4.3.2. Yüzey Özellikleri

Geliştirilen jel formülasyonlarının yüzey yükleri pozitif bulunmuştur (Tablo 4.9.). %2 ve % 3 konsantrasyonda Koyo kitosan jellerin zeta potansiyeli 66.5 ± 4 mV (gK2) ve 65.4 ± 1.3 mV (gK3) olarak bulunmuştur. Fusidik asit eklenmesiyle formülasyonların zeta potansiyeli 70.4 ± 1.5 mV (FA + gK2) ve 68.1 ± 1.2 mV (FA + gK3) elde edilmiştir. Fusidik asitin koyo kitosan jele eklenmesiyle zeta potansiyelde artış görülürken, sodyum fusidatın eklenmesiyle herhangi bir değişiklik görülmemiştir.

%2 ve % 3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jellere ait zeta potansiyel değerleri 80 ± 1.7 mV (gM2) ve 75 ± 3.2 mV (gM3) elde edilmiştir. Fusidik asit eklenmesiyle birlikte formülasyonların zeta potansiyeli 75.4 ± 1.1 mV (FA + gM2) ve 76 ± 2.2 mV (FA + gM3) elde edilmiştir. Fusidik asitin %2 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jele eklenmesiyle zeta potansiyelde azalma görülürken %3 konsantrasyondaki orta molekül ağırlıklı kitosan jele eklenmesiyle zeta potansiyelde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Orta molekül ağırlıklı kitosan jellere sodyum fusidat eklenmesiyle formülasyonların zeta potansiyeli 65.4 ± 2 mV (SF + gM2) ve 52.8 ± 8.9 mV (SF+gM3) elde edilmiştir. Sodyum fusidatın orta molekül ağırlıklı kitosan jele eklenmesiyle zeta potansiyelde anlamlı bir azalma görülmüştür (Tablo 4.9.).

%2 ve % 3 konsantrasyonda yüksek molekül ağırlıklı kitosan jellere ait zeta potansiyeli 69.2 ± 1.7 mV (gH2) ve 71.1 ± 6.8 mV (gH3) olarak bulunmuştur. Fusidik asit eklenmesiyle zeta potansiyelinde artış gözlenmiştir (FA + gH için 275.32 ± 0.6 mV ve FA + gH için 381.15 ± 1.5 mV). Fusidik asitin yüksek molekül ağırlıklı kitosan jele eklenmesiyle zeta potansiyelde artış görülürken, sodyum fusidatın eklenmesiyle zeta potansiyelde azalma gözlenmiştir.

Suda çözünen protosan kitosan jele ait zeta potansiyel 59.9 ± 2 mV (gP2) ve 59 ± 3 mV (gP3) olarak bulunmuştur. Fusidik asit eklenmesiyle zeta potansiyelde artış gözlenmiştir (FA + gP2 için 70.50 ± 1.1 mV ve FA + gP3 için 67.42 ± 1.1 mV). Sodyum fusidatın protosan kitosan jele eklenmesiyle zeta potansiyelde anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Suda çözünen Protosan kitosanın zeta potansiyeli pozitif olmakla birlikte, bazik kitosanlara göre daha düşük bulunmuştur. Farklı molekül ağırlıkta kitosanlar

karşılaştırıldığında ise, kitosanın molekül ağırlığının artışına bağlı olarak zeta potansiyelde de artış görülmüştür.

%3 konsantrasyonda Koyo kitosan jele endolizin eklenmesiyle birlikte formülasyonun (LysSA10 + gK3) zeta potansiyelinde düşüş olduğu görülmüştür ($46.3 \pm 0,7$ mV). Benzer şekilde %3 konsantrasyonda Koyo kitosan jele endolizin + fusidik asit veya endolizin + sodyum fusidat eklenmesiyle zeta potansiyelde anlamlı bir azalma görülmüştü (LysSA10 + FA gK3 için $50.8 \pm 1,3$ mV ve LysSA10 + SF + gK3 için $47 \pm 1,6$).

4.3.3. Viskozite

Boş jeller ve formülasyonlara ait viskozite değerleri Tablo 4.9., akış eğrileri Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Viskozitelerinin ölçümleri yapılırken her bir örnek için için uygun kayma hızı incelenmiştir. Bu amaçla her jel için uygun kayma hızı aralığı 10 – 90 tork olarak seçilmiştir.

Kitosanın molekül ağırlığı ve konsantrasyonunda artışa bağlı olarak viskozitede de artış olduğu gözlenmiştir. Suda çözünen kitosanın viskozitesi bazik olanlara göre düşük bulunmuştur.

%2 ve % 3 konsantrasyonda koyo kitosan jellere fusidik asit eklenmesiyle formülasyonların viskozitesinde bir değişiklik görülmezken, sodyum fusidat eklenmesiyle formülasyonların viskozitesinde artış gözlenmiştir (SF+gK3 için $876,45 \pm 2,9$ cP).

%2 ve %3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jele fusidik asit eklenmesiyle viskozitede azalma gözlenmiştir (FA + gM2 için $874,8 \pm 7,9$ cP ve FA + gM3 için $4440,1 \pm 8,6$). Sodyum fusidat eklenmesiyle de benzer şekilde viskozitede azalma gözlenmiştir. %2 ve %3 konsantrasyonda boş orta molekül ağırlıklı kitosan jellere eklenmesiyle. %2 ve %3 konsantrasyonda boş orta molekül ağırlıklı kitosan jellere fusidik asit ve sodyum fusidat eklenmesiyle formülasyonların, özellikle %2 konsantrasyonda kitosanla hazırlananların viskozitesinde azalma görülmüştür.

%2 ve % 3 konsantrasyonda boş yüksek molekül ağırlıklı kitosan jellere fusidik asit eklenmesiyle formülasyonların viskozitesi $886,8 \pm 2,8$ cP (FA + gH2) ve $4140,8 \pm 94,7$ cP (FA + gH3) elde edilmiştir. Fusidik asitin yüksek molekül ağırlıklı kitosan jele eklenmesiyle viskozitede azalma görülmüştür (Tablo 4.9.). %2 ve % 3

konsantrasyonda boş yüksek molekül ağırlıklı kitosan jellere sodyum fusidat eklenmesiyle formülasyonların viskozitesi 2983,2±26,5 cP (SF + gH2) ve 5989,6±7,2 cP (SF+gH3) elde edilmiştir. %2 ve % 3 konsantrasyonda boş yüksek molekül ağırlıklı kitosan jellere fusidik asit eklenmesiyle viskozite azalırken sodyum fusidat eklenmesiyle viskozitede artış görülmüştür.

%2 ve % 3 konsantrasyonda suda çözünen protosan kitosan jellere fusidik asit eklenmesiyle formülasyonların viskozitesi özellikle yüksek konsantrasyonda kitosan içeren jellerin viskozitesinde artış görülmüştür. Sodyum fusidat eklenmesiyle de benzer sonuç alınmıştır.

%3 konsantrasyonda Koyo kitosan jele endolizin eklenmesiyle birlikte formülasyonun viskozitesi 958,3 ±3,5 cP (LysSA10 + gK3) olarak bulunmuştur. Endolizinin koyo kitosan jele eklenmesiyle viskozitede anlamlı bir artış görülmüştür. %3 konsantrasyonda Koyo kitosan jele endolizin + fusidik asit ve endolizin + sodyum fusidat eklenmesiyle formülasyonların viskozitesi 520,75 cP (LysSA10 + FA gK3) ve 783,1 ± 5 cP (LysSA10 + SF + gK3) olarak ölçülmüştür. Endolizin + fusidik asit ve endolizin + sodyum fusidatın koyo kitosan jele eklenmesiyle viskozitede anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

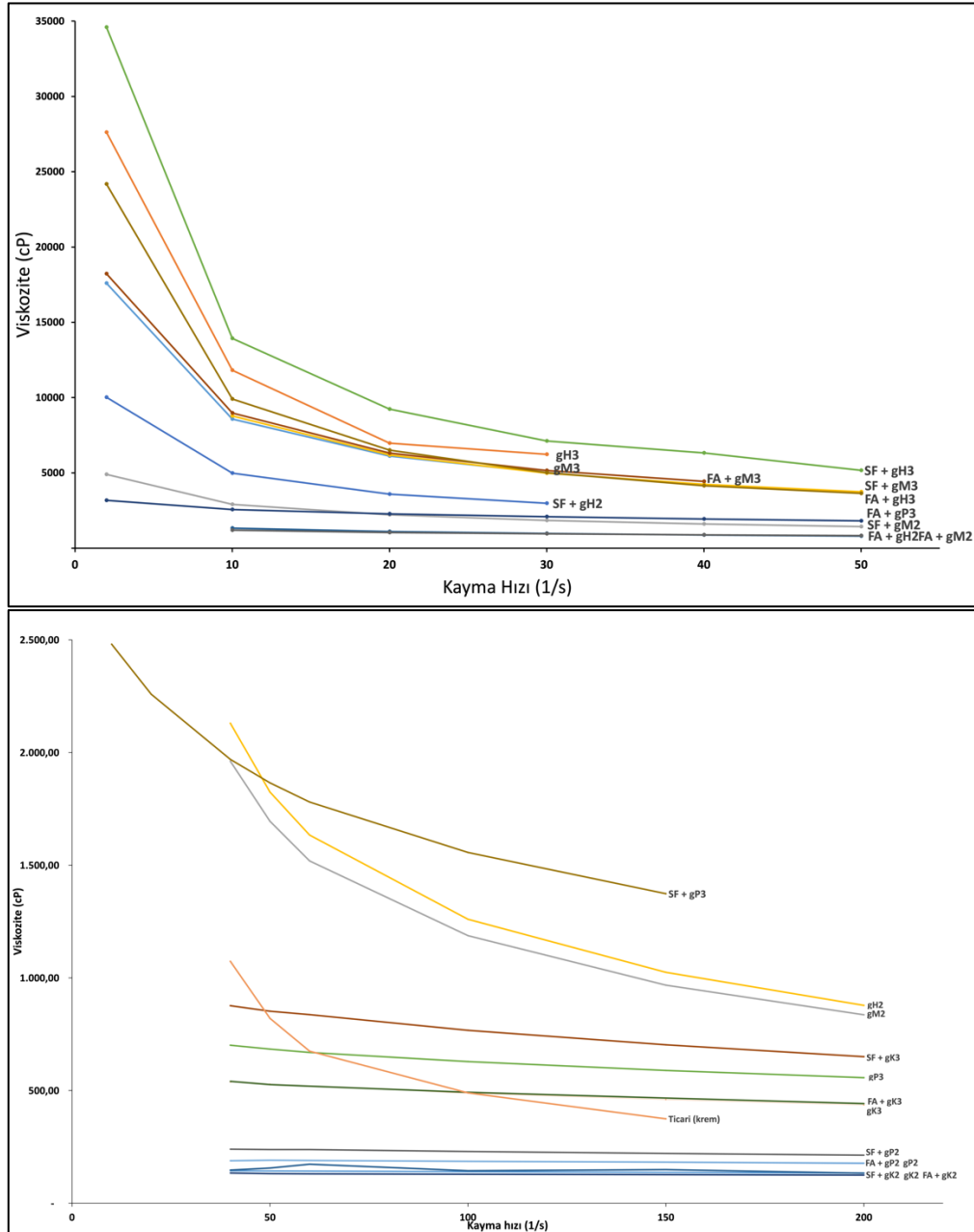
Fusidik asit ve sodyum fusidatın eklenmesinin jellerdeki viskoziteye etkisi karşılaştırıldığında sodyum fusidatın viskoziteyi daha çok etkilediği görülmüştür.

Formülasyonlara ait akış eğrileri incelendiğinde (Şekil 4.7.), çalışmalarda kullanılan tüm kitosanlar için, kitosanın özelliklerine bağlı olarak kayma hızına bağlı olarak viskozite değişmemiş yani Newtonian akış görülmüştür. Bazı kitosanlar için etkin madde ilavesiyle akış değişmiş ve kayma hızına bağlı olarak viskozitede azalma yani pseudoplastik akış görülmüştür (Şekil 4.7.).

%2 ve %3 konsantrasyonda boş koyo kitosan jellere ve orta molekül ağırlıklı kitosan jellere (gM2) fusidik asit ve sodyum fusidat ilavesi ile jellerin akış profili değişmemiştir.

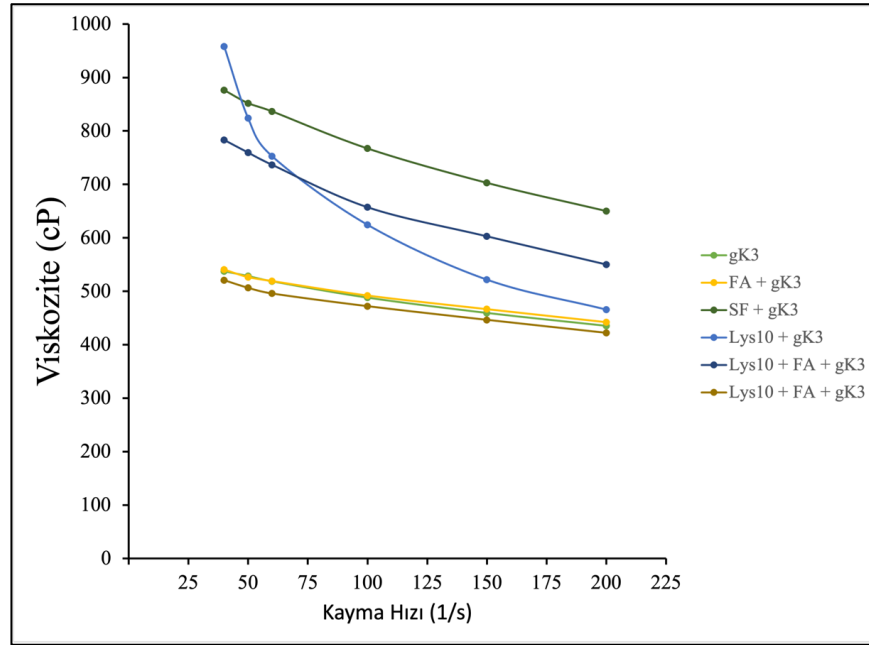
%2 konsantrasyonda yüksek molekül ağırlıklı kitosan jele fusidik asit ve sodyum fusidat ilavesiyle akış Newtonian akış olarak değişmiştir. Kitosan konsantrasyonu artırıldığında ise sodyum fusidat ve fusidik asit ilavesiyle akışta değişiklik olmamıştır.

%3 konsantrasyonda boş kitosan jel (gK3) Newtonian akış sergilerken endolizin ilavesiyle birlikte akış profili pseudoplastik akış olmuştur. Endolizin+ fusidik asit (LysSA10 + FA + gK3) veya endolizin+sodyum fusidat ilavesi (LysSA10 + SF + gK3) ilavesiyle ise akış profilinde değişiklik olmamıştır.



Şekil 4.7. Boş, fusidik asit veya sodyum fusidat yüklü kitosan jeller ve ticari ürüne ait akış eğrileri (n=3).

Fusidik asit içeren ticari krem ve sodyum fusidat içeren ticari merhem pseudoplastik akış göstermiştir. Fusidik asit içeren ticari krem viskozitesi sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha yüksek elde edilmiştir.



Şekil 4.8. Endolizin ve endolizin+fusidik asit ve endolizin sodyum fusidat içeren jellere ait akış eğrileri(n=3).

Geliştirilen formülasyonlara ait karakterizasyon çalışma sonuçları toplu olarak Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Geliştirilen jel formülasyonlarının özellikleri.

	Viskozite (cP±SS)	İn vitro adezyon (N.sec/cm ² ±SS)	Zeta Potansiyel (mV±SS)	pH
FA sol	-	-	0,93±0,2	5.5
SF sol	-	-	-26,6±5,1	7.0
LysSA10	-	-	-27,1±1,8	7.0
LysSA10 + FA sol	-	-	-29,7±1,3	6.5
LysSA10 + SF sol	-	-	-24,7±0,8	7.0
gK2	143,9 ±0	0,8 ± 0,1	66,5 ± 4,0	5
gK3	537,4±2,60	1,1 ± 0,1	65,4 ± 1,3	5
gM2	1961,2±54,80	2,3 ± 0,4	80 ± 1,7	4
gM3	5000,7± 11,50	4,1 ± 0,1	75 ± 3,2	4
gH2	2129,9±49,90	2,3 ± 0,3	69,2 ± 1,7	4
gH3	6233,2±69,50	5,9 ± 0,6	71,1 ± 6,8	4
gP2	190,2±2,90	1 ± 0,2	59,9 ± 2,0	5
gP3	701,1±2,90	1,3 ± 0,2	59 ± 3,0	5
FA + gK2	133,9±0	1,1 ± 0,1	70,4 ± 1,5	5
FA + gK3	540,7±0	1,4 ± 0,2	68,1 ± 1,2	5
FA + gM2	874,8±7,90	2,4 ± 0,3	75,4 ± 1,1	4
FA + gM3	4440,1±8,60	4,6 ± 0,6	76 ± 2,2	4
FA + gH2	886,8±2,80	2,7 ± 0,2	75,32 ± 0,6	4
FA + gH3	4140,8±94,70	4,0 ± 0,1	81,15 ± 1,5	4
FA + gP2	188,5±0	1 ± 0,3	70,50 ± 1,1	5
FA + gP3	1938,1±2,90	1,1 ± 0,1	67,42 ± 1,1	5
SF + gK2	147,2± 2,90	0,8 ± 0,2	65,1 ± 1,1	5
SF + gK3	876,45±2,90	1,2 ± 0,1	61,4 ± 0,9	5
SF + gM2	1605,7±10,3	3 ± 0,6	65,4 ± 2,0	4
SF + gM3	4233,4±22,1	4,5 ± 0,2	52,8 ± 8,9	4
SF + gH2	2.983,2±26,5	3 ± 0,3	65 ± 5,0	4
SF + gH3	5989,6±7,2	3,1 ± 0,4	64,3 ± 0,6	4
SF + gP2	239,8±2,8	1 ± 0,2	59,3 ± 2,3	5
SF + gP3	1969,5±0	1,1 ± 0,2	58,3 ± 3,1	5
LysSA10 + gK3	958,3 ±3,5	1 ± 0,12	46,3 ± 0,7	5.5
LysSA10 + FA + gK3	520,75±0	0,8 ±0,06	50,8 ± 1,3	5.5
LysSA10 + SF + gK3	783,1 ± 5.0	1 ± 0,2	47±1,6	5.5
Ticari krem (FA)	820,2 ±12,8	2,1±0,2	-8,8±0,4	4
Ticari merhem (SF)	3642 ±325,6	2,4±0,1	9,55±1,5	4

*SS: Standart Sapma

4.4. İn Vitro Çalışmalar

4.4.1. Adezyon

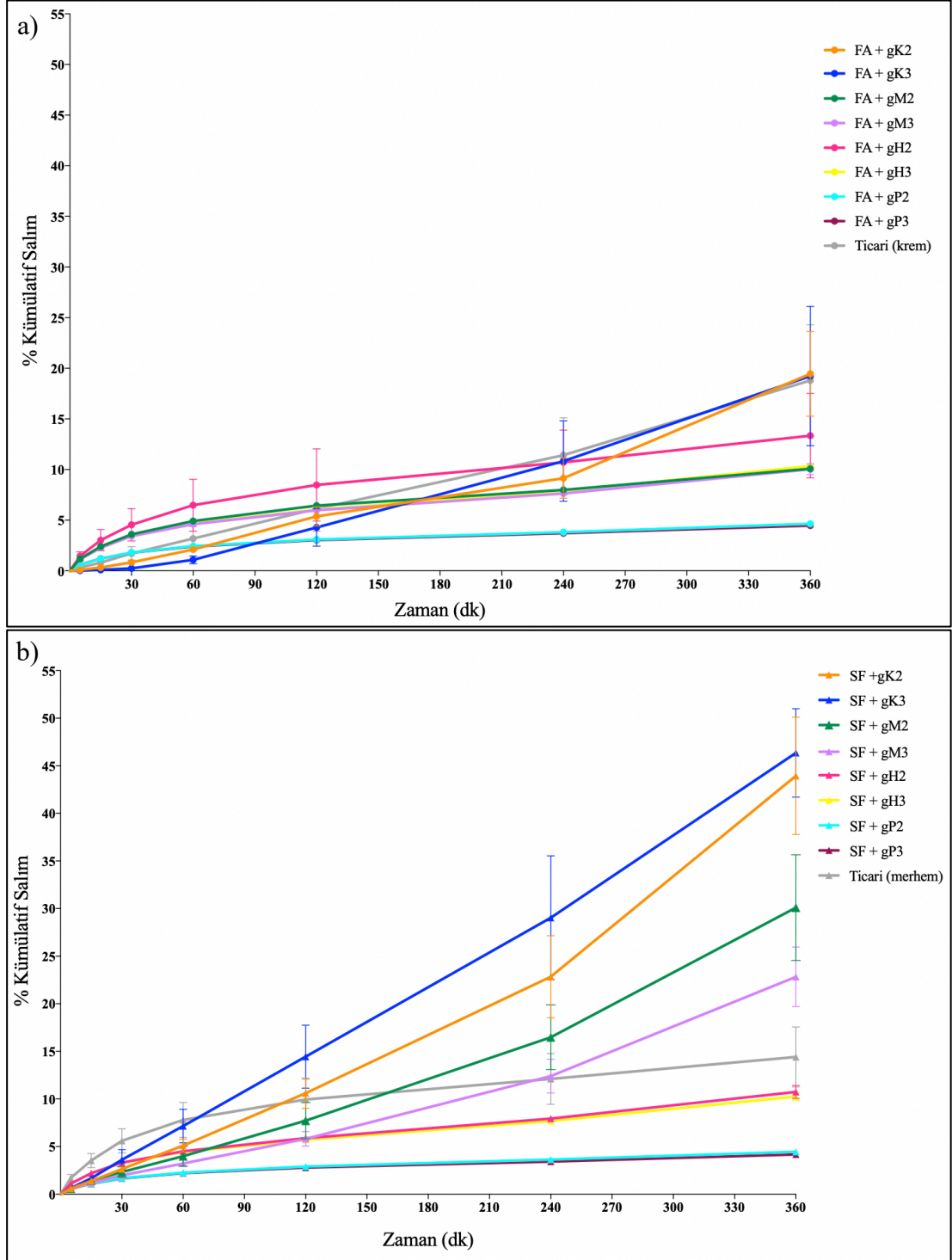
Fusidik asit veya sodyum fusidat içeren jel formülasyonlarına ait in vitro adezyon sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir. %3 konsantrasyonda yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan jel 5.9 ± 0.6 N.sec/cm² adezyon işi ile en yüksek adezif özellik sergilemiştir. Genel olarak jellere etkin madde eklenmesi jellerin adezyon özelliğini değiştirmemiştir ($p>0.05$). Kitosan konsantrasyonunun ve molekül ağırlığının artmasıyla adezyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Jellerin viskozitesi ve adezyon işi özellikleri birlikte incelendiğinde artan viskoziteye bağlı olarak adezyon işinde anlamlı bir artış görülmektedir. Piyasa preparatlarına ait adezyon incelendiğinde daha yüksek viskoziteye sahip sodyum fusidat içeren ticari merhem, fusidik asit içeren ticari kreme göre daha yüksek adezyon gösterdiği bulunmuştur (Tablo 4.9.). Sodyum fusidat içeren merhem yüksek adezyonu, içeriğinde bulunan susuz lanolinin varlığıyla açıklanabilir.

4.4.2. Şırınga Edilebilirlik

Jellere ait şırınga edilebilirlik değerleri Tablo 4.16.'da verilmiştir. Kitosan konsantrasyonu ve molekül ağırlığının artmasına bağlı olarak jellerde şırınga edilebilirlik işi de artmıştır. Geliştirilen formülasyonlarda en yüksek şırınga edilebilirlik işi fusidik asit içeren % 2 konsantrasyonda yüksek molekül ağırlıklı kitosan jelde elde edilmiştir. En yüksek şırınga edilebilirlik işi sodyum fusidat içeren ticari merhem ile elde edilmiştir ($p<0,001$). Fusidik asit içeren ticari krem için şırınga edilebilirlik işi etkin madde yüklü jel formülasyonlarına göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Ticari krem ve merhem karşılaştırıldığında, merhem şırıngadan çıkarılması için gereken kuvvet kreme göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,001$).

4.4.3. İn Vitro Salım Çalışmaları

Geliştirmiş olduğumuz formülasyonlardan ve ticari ürünlerden fusidik asit ve sodyum fusidat salım profilleri Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.



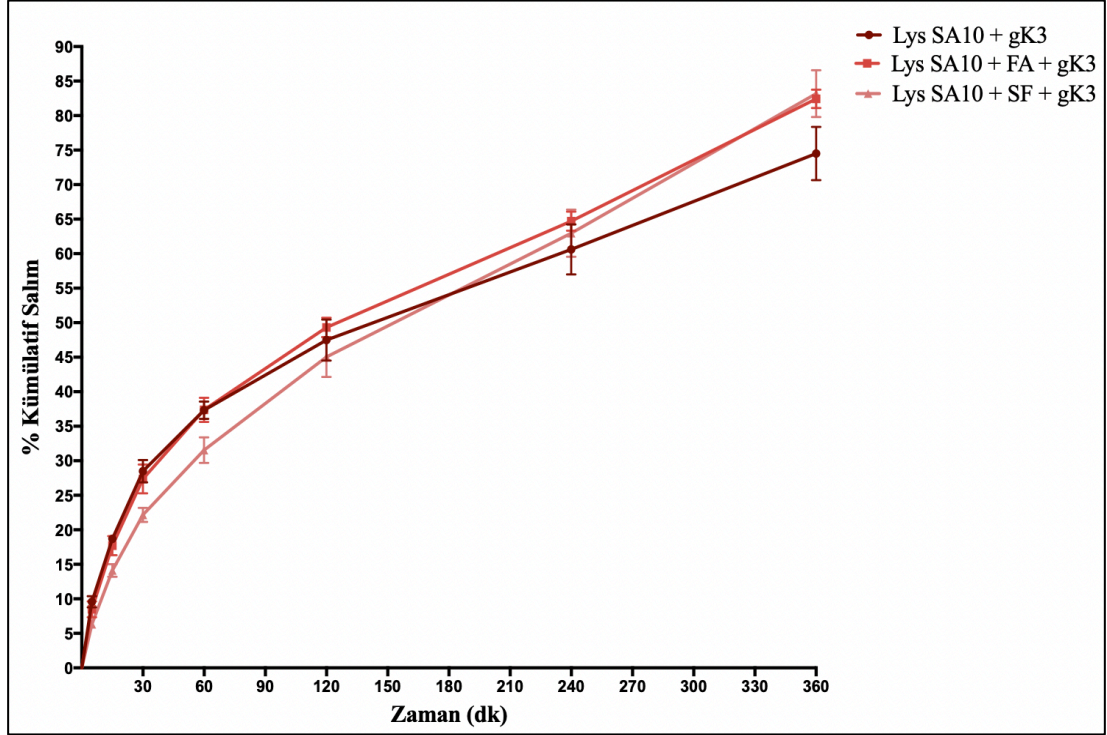
Şekil 4.9. Fusidik asit(a) ve sodyum fusidata (b) ait salım profilleri (n=6).

Fusidik asit içeren jel formülasyonlarına ait salım profilleri incelendiğinde 6. saatin sonunda en yüksek salım $19,5 \pm 4,2$ oranında %2 konsantrasyonda Koyo kitosan içeren jel formülasyonunda (FA + gK2) görülmüştür. Kitosan konsantrasyonunun artması ilaç salımında değişikliğe neden olmamıştır ($p > 0,05$). Ancak artan kitosanın molekül ağırlığı ile salınan fusidik asit miktarında azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.9a.).

Sodyum fusidat içeren jel formülasyonları için 6. saatin sonunda en yüksek salım $46,4 \pm 4,6$ oranında %3 konsantrasyonda Koyo kitosan içeren jel formülasyonunda (SF + gK3) görülmüştür. Kitosan konsantrasyonunun salım üzerine etkisi olmazken, artan molekül ağırlığı ile salınan sodyum fusidat miktarında azalma görülmüştür ($p < 0,0001$) (Şekil 4.9b.). Fusidik asitin salımının sodyum fusidata göre en az 2 kat daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde diğer kitosanlarla da aynı sonuç alınmıştır (Şekil 4.9a. ve Şekil 4.9b.). Bu durum sodyum fusidatın suda çözünürlüğünün fusidik asite göre daha yüksek olması nedeniyledir.

Fusidik asit içeren ticari kremden salım profili incelendiğinde 6. saat sonunda fusidik asit içeren koyo kitosan jeller (FA + gK2 ve FA + gK3) ile benzer miktarda salım olduğu görülmüştür ($18,8 \pm 5,5$) ($p > 0,5$). Sodyum fusidat içeren ticari merhemden salım incelendiğinde, geliştirdiğimiz formülasyonlara göre genel olarak daha düşük salım gözlemlenmiştir ($p < 0,0001$). Fusidik asit içeren ticari krem ve sodyum fusidat içeren ticari merhem için 6. saatin sonunda salınan etkin madde miktarının ise benzer olduğu görülmüştür ($p > 0,05$) (Şekil 4.9a. ve Şekil 4.9b.).

Endolizin ve endolizin+antibiyotik kombinasyonu içeren jel formülasyonları için 6. saatin sonunda en yüksek salım $83,19 \pm 3,39$ oranında endolizin + sodyum fusidat içeren %3 konsantrasyonda Koyo kitosan jel formülasyonunda (LysSA10 + SF + gK3) görülmüştür (Şekil 4.10.). Yalnızca endolizin içeren kitosan jel, endolizin + fusidik asit ve endolizin + sodyum fusidat içeren kitosan jellere göre viskozitesinin daha yüksek olması ($958,3 \pm 3,5$ cP), kitosan jelden endolizin salımının daha az olmasını açıklamaktadır (Tablo 4.10.). Endolizin + Fusidik asit içeren jel ile endolizin + sodyum fusidat içeren jelden endolizin salımı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 4.10. Endolizin, endolizin + fusidik asit ve endolizin sodyum fusidat içeren jellere ait salım profilleri (n=3).

Tablo 4.10. Jel formülasyonlarından etkin madde salımı.

Formülasyon Kodu/dk	% salınan etkin madde						
	5	15	30	60	120	240	360
FA + gK2	0,10	0,34	0,84	2,11	5,37	9,15	19,46
FA + gK3	0,02	0,10	0,24	1,09	4,28	10,83	19,24
FA + gM2	1,19	2,41	3,6	4,92	6,44	8,00	10,08
FA + gM3	1,13	2,27	3,42	4,60	5,98	7,64	10,04
FA + gH2	1,45	3,02	4,55	6,49	8,48	10,71	13,35
FA + gH3	1,15	2,28	3,43	4,69	6,05	7,89	10,34
FA + gP2	0,60	1,20	1,81	2,45	3,10	3,83	4,65
FA + gP3	0,61	1,20	1,80	2,40	3,04	3,72	4,48
SF + gK2	0,59	1,39	2,64	5,10	10,60	22,85	43,94
SF + gK3	0,64	1,67	3,61	7,16	14,45	29,04	46,36
SF + gM2	0,58	1,43	2,32	3,99	7,72	16,48	30,10
SF + gM3	0,57	1,20	1,99	3,22	5,80	12,40	22,83
SF + gH2	1,10	2,21	3,31	4,51	5,89	7,94	10,75
SF + gH3	1,10	2,19	3,28	4,43	5,71	7,69	10,26
SF + gP2	0,57	1,13	1,69	2,27	2,90	3,64	4,46
SF + gP3	0,55	1,10	1,65	2,22	2,79	3,43	4,17
LysSA10 + gK3	9,57	18,70	28,50	37,32	47,48	60,63	74,50
LysSA10 + FA + gK3	8,48	17,70	27,37	37,39	49,31	64,71	82,42
LysSA10 + SF + gK3	6,33	14,11	22,16	31,53	45,04	62,96	83,19
Fusidik asit içeren ticari krem	0,33	0,80	1,73	3,19	6,13	11,42	18,81
Sodyum fusidat içeren ticari merhem	1,70	3,53	5,60	7,80	9,95	12,11	14,42

Salım çalışmalarının 6. saati sonunda salınan ve membranda kalan etkin madde miktarları Tablo 4.11.'de verilmiştir. 6 saatin sonunda salınan ve membranda kalan fusidik asit ve sodyum fusidat miktarları incelendiğinde salım ortamına geçen etkin madde miktarı azaldıkça membranda kalan etkin madde miktarında artış olduğu gözlenmiştir. Etkin maddenin membranda birikimi deri üzerinde oluşan enfeksiyonun lokal tedavisinde etkili rol oynayacaktır. Membranda kalan miktarı fazla olan jellerden etkin madde salımının daha yavaş olduğu gözlemlenmiştir. Bu da kitosan jel varlığında etkin maddenin deri üzerinden kontrollü salımının gerçekleştirdiğinin

göstergesidir. Geliştirilen jel formülasyonlarında fusidik asitin % 62,4'ten fazlasının membranda kaldığı görülmekte olup bu değer fusidik asit içeren ticari kremden daha fazladır. Bu durum da fusidik asitin geliştirdiğimiz jel formülasyonlarından kreme göre daha yavaş salım sağladığını göstermektedir.

Sodyum fusidat içeren jel formülasyonları sodyum fusidat içeren ticari merhem ile karşılaştırıldığında sodyum fusidat içeren %2 ve %3 konsantrasyonda koyo kitosan ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel formülasyonlarının (SF+ gK2, SF + gK3, SF + gM2, SF+gM3) membranda kalan sodyum fusidat miktarı $<41,8$ olması nedeniyle sodyum fusidat içeren ticari merheme ($48,2 \pm 10,9$) göre membranda daha az sodyum fusidatın biriktiği görülmüştür. Koyo ve orta molekül ağırlıklı kitosandan sodyum fusidat daha hızlı bir salım profili sergilemiştir. İlacın membrandan geçişi uygulanan formülasyonun özellikleri ile yakından ilişkilidir. Etkin maddenin öncelikle verildiği formülasyondan salınması gerekmektedir. Daha sonra etkin madde membrana geçecektir.

Bununla birlikte sodyum fusidat içeren %2 ve %3 konsantrasyonda yüksek molekül ağırlıklı kitosan ve protosan kitosan jel formülasyonlarının (SF + gH2, SF + gH3, SF + gP2, SF + gP3) membranda kalan sodyum fusidat miktarı $>82,8$ olması nedeniyle sodyum fusidat içeren ticari merheme ($48,2 \pm 10,9$) göre daha fazla sodyum fusidatın membranda biriktiği görülmüştür. %2 ve %3 konsantrasyonda yüksek molekül ağırlıklı ve protosan jellerin (gH2, gH3, gP2, gP3) sodyum fusidatın salımını yavaşlattığı ve daha uzun süre salım sağladığı gözlemlenmiştir.

Fusidik asit içeren ticari krem ve sodyum fusidat içeren ticari merheme ait salınan ve membranın üzerinde kalan etkin madde miktarlarının toplamı yaklaşık olarak % 62 olarak bulunmuştur. Diğer %40 civarında miktarın tayin edilememe nedeninin, fusidik asit ve sodyum fusidatın krem ve merhemden ekstraksiyonu sırasında geri kazanım yüzdesinin düşük olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Tablo 4.11. Salım çalışmasının 6. saati sonunda salınan ve membranda kalan etkin madde miktarları.

	% Etkin Madde Salım Miktarı ± SS	% Membranda Kalan ± SS
Fusidik asit içeren		
FA + gK2	19,5± 4,20	62,70 ± 7,00
FA + gK3	19,2 ± 6,80	62,40 ± 3,60
FA + gM2	10,08 ± 0,22	85,36 ± 2,10
FA + gM3	10,04 ± 0,54	85,27 ± 5,70
FA + gH2	13,35 ± 5,10	83,60 ± 0,80
FA + gH3	10,30 ± 0,19	76,05 ± 4,27
FA + gP2	4,65 ± 0,20	92,70 ± 0,47
FA + gP3	4,48 ± 0,02	95,09 ± 0,80
Sodyum fusidat içeren		
SF + gK2	43,94 ± 6,16	41,81 ± 3,70
SF + gK3	46,36 ± 4,65	36,91 ± 5,40
SF + gM2	30,10 ± 5,55	21,48 ± 3,70
SF + gM3	22,83 ± 3,13	32,45 ± 3,90
SF + gH2	10,75 ± 0,68	83,3 ± 1,90
SF + gH3	10,30 ± 0,40	82,8 ± 1,60
SF + gP2	4,46 ± 0,16	83,4 ± 1,90
SF + gP3	4,17 ± 0,08	83,08 ± 1,30
Endolizin içeren		
LysSA10 + gK3	74,50 ± 3,87	21,03 ± 0,44
Endolizin + Fusidik asit içeren		
LysSA10 + FA + gK3	82,42 ± 1,34	22,52 ± 1,63
Endolizin + Sodyum fusidat içeren		
LysSA10 + SF + gK3	83,19 ± 3,39	16,97 ± 4,18
Piyasa Preparatları		
Ticari krem (FA)	18,80 ± 5,50	50,20 ± 7,90
Ticari merhem (SF)	14,40 ± 3,20	48,20 ± 10,90

Membran inertlik çalışması sonucunda elde edilen % geri kazanım değerleri Tablo 4.12.'de gösterilmektedir. Topikal ilaç ürünleri için in vitro salım testi çalışmalarına ait kılavuza etkin maddelere ait geri kazanımın analiz süresi sonunda %100 ± %5 aralığında olmasını önermektedir. Etkin maddelere ait çalışma sonuçları incelendiğinde fusidik asit, sodyum fusidat ve endolizin için % geri kazanım değerleri uygun aralık içinde elde edilmiştir. Salım çalışmalarında kullanılan membranların etkin maddeler ile geçimli olduğu ve membranın etkin maddelere bağlanmadığı gösterilmiştir.

Tablo 4.12. İnertlik çalışması sonucu elde edilen % geri kazanım değerleri.

Saat	Fusidik Asit		Sodyum Fusidat		Endolizin	
	% Geri Kazanım (Membransız)	% Geri Kazanım (Membranlı)	% Geri Kazanım (Membransız)	% Geri Kazanım (Membranlı)	% Geri Kazanım (Membransız)	% Geri Kazanım (Membranlı)
0	99,26 ± 1,01	101,66 ± 1,08	99,4 ± 1,02	98,74 ± 2,4	99,96 ± 0,1	98,5 ± 0,35
6	100,94 ± 0,32	101,79 ± 1,15	97,54 ± 1,05	97,53 ± 0,92	97,33 ± 2,82	99,5 ± 2,82

4.4.4. Antibakteriyel Aktivite Çalışmaları

MRSA standart ve klinik izolatlarına karşı jellerle elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) sonuçları Tablo 4.13.'te gösterilmiştir.

Kitosan Jellerin Antibakteriyel Aktivitesi

%2 ve %3 konsantrasyonda Koyo kitosan jellerin (gK2 ve gK3) ATCC 33862, ATCC 6538, *MRSA4*, TRSA2, TRSA 8, TRSA45, TRSA32, TRSH1 ve TRSE6 suşlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.13.). Koyo kitosan jelin konsantrasyonunun artışına bağlı olarak ATCC 33862, TRSA2 ve , *MRSA4* suşlarına karşı antibakteriyel aktivitede artış, ATCC 6538, TRSA 32, suşlarına karşı ise antibakteriyel aktivitede azalma gözlenmiştir. Koyo kitosanın konsantrasyonundaki artış ATCC 33862, TRSA2 ve *MRSA4* suşlarına karşı antibakteriyel aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir. % 2 ve %3 konsantrasyonda boş koyo kitosan jel (gK2,gK3) Orta molekül ağırlıklı kitosan jelin (gM) konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak antibakteriyel aktivitede belirgin farklılıklar elde edilmemiştir. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan jelin (gH) konsantrasyonunun artmasıyla ATCC 43300, TRSA 32, TRS45 suşlarına karşı antibakteriyel etki artarken diğer suşlara karşı ise etkide azalma gözlenmiştir. % 2 konsantrasyonda yüksek molekül ağırlıklı kitosan jel (gH2), TRSA2 suşuna karşı yüksek aktivite gösterirken, konsantrasyonun artışına bağlı olarak aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan jelin (gH) TRSA2 suşuna karşı etkinliği diğer suşlara göre konsantrasyondan daha çok etkilendiği görülmektedir. Protosan jelin konsantrasyonunun artmasıyla ATCC 43300, TRSA32,

MRSA4 ve TRSH1 suşlarına karşı etkide artış gözlenmiştir. % 2 konsantrasyonda protosan jel (gP2) diğer suşlara göre ATCC 33862 suşuna yüksek aktivite gösterirken, konsantrasyonda artışa bağlı olarak TRSA32 ve MRSA 4 suşlarına karşı aktivite artmıştır. Kitosanın molekül ağırlığının artışına bağlı olarak ATCC 33862, ATCC43300, TRSA2, TRSA8 ve TRSH1 suşlarına karşı antibakteriyel aktivitede artış gözlemlenmiştir. Genel olarak incelenen izolatalara karşı incelenen kitosanların tek başına antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmüştür.

Suda çözünen protosan jeller ve koyo kitosan jellerin antibakteriyel aktivitesi karşılandığında, suda çözünen protosan jellerin ATCC 33862, ATCC 43300, ATCC 6538 ve MRSA4 suşlarına karşı koyo kitosan jele göre daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür.

Antibakteriyel aktivitenin kullanılan kitosanın konsantrasyonu ve molekül ağırlığına göre farklılıklar gösterdiği bulunmuştur.

Fusidik Asit İçeren Jellerin Antibakteriyel Aktivitesi

Fusidik asitin etanoldeki çözeltisinin tek başına en etkili olduğu suşlar) TRSH1 ve TRSE6 (MİK <0,0006 µg/mL) olarak bulunmuştur. ATCC43300 ve MRSA4 suşlarına karşı bulunan MİK değerleri sırasıyla <0,0009 µg/mL ve <0,0027 µg/mL olup, fusidik asidin ATCC 43300 suşuna karşı MRSA4'e göre 3 kat daha etkili olduğu görülmüştür.

Kitosan jellere fusidik asit inkorpore edildiğinde genel olarak incelenen suşlara (ör. ATCC 33862, ATCC 6538, TRSA2, TRSA32, TRSE6 ve MRSA4) karşı antibakteriyel aktivitenin (MİK : <0,0006 µg/mL) arttığı görülmüştür (Tablo 4.13.). Kitosanın molekül ağırlığıdaki artışının antibakteriyel aktivitede değişikliğe neden olmamıştır.

Fusidik asit içeren ticari krem tüm suşlara karşı yüksek antibakteriyel aktivite (MİK : <0,0006 µg/mL) göstermiştir. Geliştirdiğimiz formülasyonların fusidik asit içeren ticari krem ile benzer yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

Sodyum Fusidat İçeren Jellerin Antibakteriyel Aktivitesi

Sodyum fusidatın sudaki çözeltisinin en etkili olduğu suş TRSA8 (MİK : 0,019 µg/mL) olduğu tespit edilmiştir. ATCC 43300 ve MRSA4 suşlarına karşı bulunan MİK değerleri sırasıyla 0,2135 µg/mL ve 0,038 µg/mL olup, sodyum fusidatın MRSA4 suşuna karşı daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Sodyum fusidatın antibakteriyel aktivitesinin kitosan varlığında arttığı görülmüştür. Kitosanın tipi (bazik veya suda çözünen), molekül ağırlığı ve konsantrasyonunun antibakteriyel aktiviteyi etkilemediği görülmüştür.

Sodyum fusidat yüklü jeller ATCC 33862, ATCC 6538, TRSA2, TRSA45 ve TRSH1 suşlarına karşı en yüksek aktiviteyi (MİK : <0,0006 µg/mL) göstermiştir.

Sodyum fusidat içeren ticari merhem ATCC 43300 ve ATCC 6538 suşlarına karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi (MİK 0,076 µg/mL) göstermiştir. ATCC 43300 ve MRSA4 suşlarına karşı hazırlanan tüm jel formülasyonlarının sodyum fusidat içeren ticari merhemden daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Geliştirilen formülasyonların etkinliğinin sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha etkili gösterilmiştir.

Endolizin İçeren Jellerin Antibakteriyel Aktivitesi

Endolizinin tek başına çözelti halinde antibakteriyel aktivitesi ile karşılaştırıldığında, kitosan varlığında antibakteriyel aktivitesinde tüm suşlara karşı artış görülmüş olup, TRSA32 suşuna karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi (MİK: 0,12 µg/mL) göstermiştir. ATCC 43300 suşuna karşı endolizin tek başına 31,25 µg/mL, kitosan jel ile inkorpore edildiğinde (LysSA10 + gK3) 0,24 µg/mL MİK elde edilmiştir. MRSA4 suşuna karşı ise endolizin çözeltisi için elde edilen MİK değeri 62,5 µg/mL, kitosan jele yüklendiğinde ise (LysSA10 + gK3) 0,24 µg/mL' dir. Ticari ürün ile karşılaştırıldığında ise endolizin içeren jelin antibakteriyel aktivitesi daha düşük bulunmuştur.

Endolizin+ Fusidik Asit Kombinasyonu İçeren Jellerin Antibakteriyel Aktivitesi

Endolizin+fusidik asit kombinasyonunu içeren çözeltinin en etkili olduğu bakteri suşu ATCC 6538 olarak bulunmuştur. ATCC 43300 ve MRSA4 suşlarına karşı elde edilen MİK değerleri sırasıyla 0,076 µg/mL ve 0,0038 µg/mL'dir. Endolizin+fusidik asit kombinasyonunu içeren çözeltinin MRSA4 suşuna karşı ATCC43300'e göre 2 kat daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Endolizin çözeltisinin tek başına ATCC 43300 ve MRSA4 suşlarına karşı etkinliği ile karşılaştırıldığında endolizin+ fusidik asit kombinasyonunun antibakteriyel aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 4.13.)

Endolizin+fusidik asit kombinasyonu kitosan ile inkopore edildiğinde ATCC 43300 suşuna karşı antibakteriyel aktivitede artış olduğu (MİK 0,008 µg/mL) görülmüştür . MRSA4 suşuna karşı ise antibakteriyel aktivitede anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Endolizin+ fusidik asit kombinasyonu içeren jel formülasyonu en yüksek antibakteriyel aktiviteyi %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel varlığında MRSA4 suşuna karşı göstermiştir (MİK 0,005 µg/mL) göstermiştir. Endolizin+ fusidik asit kombinasyonu %3 konsantrasyonda kitosan jel varlığında (LysSA10 + FA +gK3), endolizin + koyo kitosan jel (LysSA10 + gK3) ile karşılaştırıldığında ATCC43300 ve MRSA4 suşlarına karşı artmış antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu %3 konsantrasyonda kitosan jel varlığında (LysSA10+FA+gK3) ATCC 43300 ve MRSA4'e karşı daha etkili bulunmuştur. Ticari merhem ile karşılaştırıldığında ise geliştirdiğimiz formülasyon (LysSA10 + FA + gK3) ATCC 43300 ve MRSA4 suşlarına karşı daha etkili bulunmuştur.

Endolizin+sodyum fusidat kombinasyonu içeren antibakteriyel aktivitesi

Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonunu içeren çözeltinin en etkili olduğu bakteri suşları ATCC 6538 ve TRSA2 olarak (MİK: 0,00006 µg/mL) elde edilmiştir. ATCC 43300 ve MRSA4 suşlarına karşı etkinliği sırasıyla 0,0095 µg/mL ve 0,00048 µg/mL MİK elde edilmiştir. Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonunu içeren çözeltinin MRSA4 suşuna karşı ATCC43300'e göre yaklaşık 20 kat daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Endolizin çözeltisinin ve sodyum fusidat çözeltisinin tek

başına ATCC 43300 ve MRSA4 suşlarına karşı etkinlikleri ile karşılaştırıldığında endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu ile endolizinin ve sodyum fusidatın antibakteriyel aktivitesini artırdığı görülmektedir.

Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel varlığında MRSA4 suşuna karşı en yüksek antibakteriyel aktiviteyi (MİK: 0,013 µg/mL) göstermiştir. ATCC 43300 (MİK: 0,07 µg/mL) ve MRSA4 (MİK: 0,013 µg/mL) suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesi arasında endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel MRSA4 suşuna karşı yaklaşık 2 kat daha etkilidir. ATCC 43300 ve MRSA4 suşuna karşı endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu tek başına çözelti halindeki antibakteriyel aktivitesi ile karşılaştırıldığında çözeltinin endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu %3 konsantrasyonda koyo kitosan jele göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jel (LysSA10 + SF + gK3), endolizin + koyo kitosan jel (LysSA10 + gK3) ile karşılaştırıldığında, ATCC 43300 ve MRSA4 suşuna karşı antibakteriyel aktivitenin arttığı gözlemlenmiştir. Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jel (LysSA10 + SF + gK3) ATCC 43300 ve MRSA4'e karşı endolizin + koyo kitosan jelden (LysSA10 + gK3) daha etkili bulunmuştur.

Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jelin ticari merheme göre MRSA4 suşlarına karşı daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. ATCC 43300 suşuna karşı ise antibakteriyel aktivite anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Tablo 4.13. Kontrol grupları ve formülasyonlara ait standart ve klinik izolatlara karşı elde edilen MİK değerleri.

		ATCC 33862	ATCC 43300	ATCC 6538	MRSA4	TRSA2	TRSA8	TRSA45	TRSA32	TRSH1	TRSE6
Sıra No	Çalışma grubu	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)
1	FA	0,043	0,0009	0,0095	0,0027	0,076	0,0018	0,0098	0,31	<0,0006	<0,0006
2	SF	0,04	0,2135	0,038	0,038	0,076	0,019	0,057	0,153	0,153	1,22
3	gK2	19,53	9,77	156,25	9,77	29,3	0,153	9,77	0,232	0,38	1,83
4	gK3	14,65	7,325	234,38	1,83	21,2	0,0865	7,33	4,58	1,37	1,37
5	gM2	1,83	0,915	4,89	0,61	2,44	0,0955	0,915	0,46	0,46	0,61
6	gM3	3,66	1,144	7,325	1,83	7,325	2,745	0,686	1,83	1,37	2,29
7	gH2	0,915	1,22	1,22	0,765	0,0012	0,019	0,915	0,61	0,153	0,915
8	gH3	3,66	0,9725	7,325	0,97	14,65	3,66	2,29	0,058	0,458	3,66
9	gP2	0,915	7,33	14,65	2,44	78,125	2,44	7,33	1,83	2,44	1,22
10	gP3	3,66	1,83	14,65	0,915	87,0	2,75	7,33	0,915	1,37	1,37
11	FA + gK2	<0,0006	0,00715	<0,0006	0,0018	<0,0006	0,0072	0,0107	0,038	0,0095	0,23
12	SF + gK2	<0,0006	0,0048	<0,0006	0,0024	<0,0006	0,0036	<0,0006	0,0475	<0,0006	0,31
13	FA + gK3	<0,0006	0,00715	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,0072	0,0018	0,0009	0,0095	0,1145
14	SF + gK3	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,193
15	FA + gM2	<0,0006	0,0095	<0,0006	0,006	0,0143	0,0095	0,0036	0,038	0,00715	0,153
16	SF + gM2	<0,0006	0,0095	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,153	<0,0006	0,1145
17	FA + gM3	0,0009	0,0024	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,0018	0,0072	0,057	0,019	0,1145
18	SF + gM3	<0,0006	0,009	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,076	0,0119	0,1145
19	FA + gH2	0,0012	0,0015	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,0048	<0,0006	0,038	0,0018	0,057
20	SF + gH2	<0,0006	0,0048	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,0012	<0,0006	0,153	0,00595	0,31
21	FA + gH3	<0,0006	0,0048	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,115	0,115	0,31
22	SF + gH3	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,115	0,076	0,174
23	FA + gP2	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,153	<0,0006	0,153
24	SF + gP2	<0,0006	0,00715	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,153	<0,0006	0,153
25	FA + gP3	<0,0006	0,0048	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,0024	0,0015	0,038	0,003	0,153
26	SF + gP3	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	0,057	<0,0006	0,153

Tablo 4.14. Endolizin ve endolizin+fusidik asit/sodyum fusidat içeren jel formülasyonları ve piyasa preparatlarına ait standart ve klinik izolatlara karşı elde edilen MİK değerleri.

		ATCC 33862	ATCC 43300	ATCC 6538	MRSA4	TRSA2	TRSA8	TRSA45	TRSA32	TRSH1	TRSE6
Sıra No	Çalışma grubu	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)	MİK (µg/mL)
27	LysSA10	>125	31,25	125	62,5	>125	7,8	15,6	62,5	7,81	15,63
28	LysSA10 + FA	0,0076	0,076	<0,000015	0,0038	0,00024	0,00048	0,00095	0,0153	0,031	0,12
29	LysSA10 + SF	0,0076	0,0095	0,00006	0,00048	0,00006	0,00048	0,0019	0,0153	0,0019	0,12
30	LysSA10 + gK3	7,8	0,24	15,63	0,24	15,63	0,24	0,977	0,12	0,489	0,06
31	LysSA10 + FA + gK3	-	0,008	-	0,005	-	-	-	-	-	0,06
32	LysSA10 + SF + gK3	-	0,07	-	0,013	-	-	-	-	-	0,12
33	Fusidik asit içeren ticari krem	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	<0,0006	1,22
34	Sodyum fusidat içeren ticari merhem	0,115	0,076	0,076	0,153	0,155	0,46	0,115	0,115	0,23	1,22

4.4.5. Stabilite

Hazırlanan jel formülasyonlarına ait stabilite sonuçları Tablo 4.15.'te verilmiştir. Geliştirilen jel formülasyonlarının 4°C, 25°C ve 40°C'de 12 ay boyunca stabil olduğu gösterilmiştir.

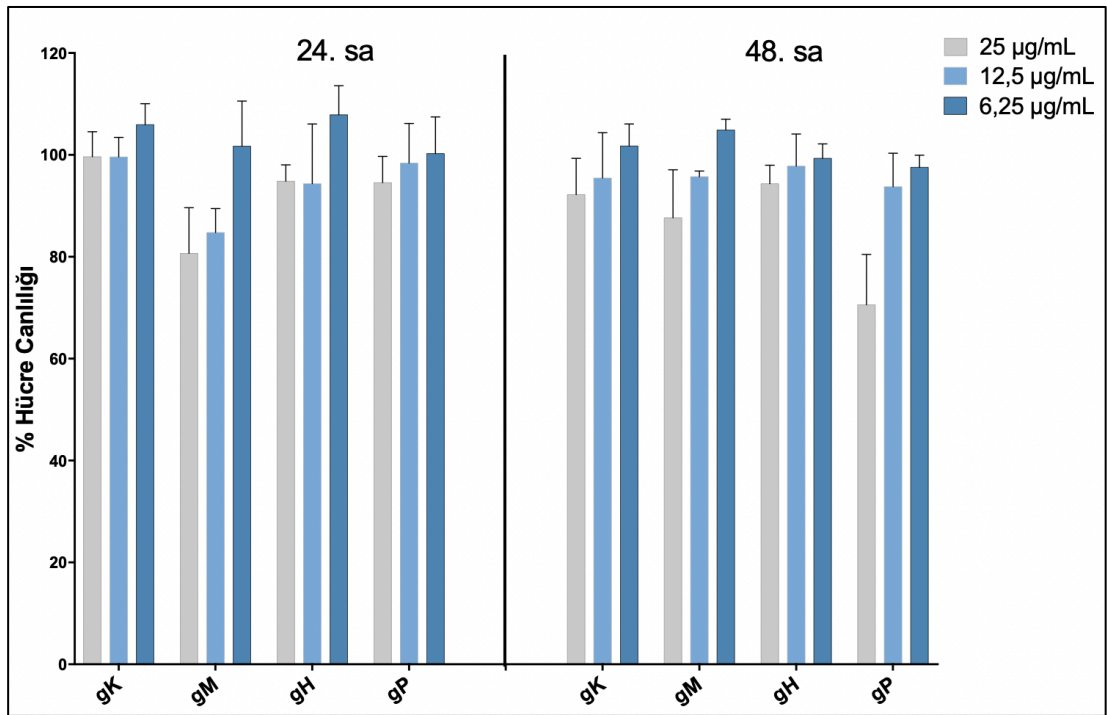
Tablo 4.15. Jel formülasyonlarına ait stabilite sonuçları.

Çalışma grupları	3. ay								
	pH			Viskozite (cP+SS)			In vitro adezyon (N.sec/cm ² ±SS)		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
gK3	5	5	5	457,7±8,1	400,8±0,1	396,8	1,1±0,05	0,9±0,2	0,9±0,1
gM3	4	4	4	5146,2±5,8	4786,7±28,4	4642,1±6,1	4,05±0,2	2,5±0,5	2,3±0,02
FA + gK3	5	5	5	478,9±6,9	449,8±5,3	456,4	0,9±0,1	0,8±0,2	0,8±0,1
FA + gM3	4	4	4	5171,3	5171,3	4309,4	3,9±0,4	3,6±0,01	3±0,03
SF + gK3	5	5	5	535,7±5,1	562,2±5,8	506±1,4	1,1±0,07	1,03±0,07	1±0,04
SF + gM3	4	4	4	4336,5±46,8	4322±21,5	4309,4	4,5±0,4	3,9±0,1	3±0,1
Lys10 + gK3	5,5	5,5	5,5	929±4,2	834,7±1,8	765,6±5,3	1,03±0,1	0,8±0,1	0,7±0,1
Lys10 + FA + gK3	5,5	5,5	5,5	562,1±5,7	456,4±3,4	403,4±1,4	0,9±0,01	0,7±0,06	0,6±0,06
Lys10 + SF + gK3	5,5	5,5	5,5	795,8±1,8	793,8±0,2	749,8±5,7	0,9±0,2	0,9±0,2	0,8±0,2
6. ay									
gK3	5	5	5	454,4±2,4	399,2±0,6	385,5±2	1,01±0,06	0,9±0,1	0,9±0,2
gM3	4	4	4	4646,2±25,8	4730±13	4438,5±4,4	3,8±0,09	2,3±0,4	2,2±0,1
FA + gK3	5	5	5	472,2±3,4	446,4±0,05	464,2±17,3	0,9±0,2	0,7±0,2	0,8±0,1
FA + gM3	4	4	4	4671,3	4548,1	4004,2	3,8±0,6	3,7±0,1	3,1±0,3
SF + gK3	5	5	5	569,1±2,4	555,7	485,6±16,7	1,1±0,06	1±0,02	0,9±0,08
SF + gM3	4	4	4	4436,5±46,8	4212,7±2,8	4182,9±57,2	4,4±0,2	3,9±0,3	2,95±0,5
Lys10 + gK3	5,5	5,5	5,5	931,7±22,2	864,6±1,2	767,1	1±0,36	0,8±0,08	0,7±0,07
Lys10 + FA + gK3	5,5	5,5	5,5	575,4±16,9	486,5±0,1	400,4±2,6	0,9±0,3	0,8±0,04	0,7±0,1
Lys10 + SF + gK3	5,5	5,5	5,5	791,5±1,1	770±5,6	734,7±3,8	0,8±0,2	0,9±0,2	0,8±0,04
12. ay									
gK3	5	5	5	418,2±13	403,6±5,1	410,2±0,5	1±0,2	0,88±0,06	0,9 ±0,2
gM3	4	4	4	4344,1±17,2	4435,3±9,1	4430,4±13	3,8±0,1	2,3±0,2	2,05±0,3
FA + gK3	5	5	5	460,5±33,3	457,3±0,2	459,3±5,7	0,9±0,1	0,8±0,2	0,8±0,04
FA + gM3	4	4	4	4226,4±57,7	4444,1±0,2	4348,8±70,7	3,7±0,4	3,7±0,2	3,2±0,1
SF + gK3	5	5	5	561,3±29,8	550,5±0,05	494,5±6,4	1,03±0,1	1±0,03	1±0,05
SF + gM3	4	4	4	4133,4±46,8	4094,7±62,1	4199,4±50,9	4,2±0,1	3,8±0,2	3±0,1
Lys10 + gK3	5,5	5,5	5,5	902,3±25,5	858,3±0,6	790,4±4	1,01±0,1	0,8±0,1	0,7±0,06
Lys10 + FA + gK3	5,5	5,5	5,5	570,1±11,1	479,1±11,5	444,8±7,5	0,9±0,1	0,9±0,2	0,7±0,1
Lys10 + SF + gK3	5,5	5,5	5,5	788,7±4,75	774,2±6	754,6±5,9	0,9±0,03	0,9±0,1	0,8±0,02

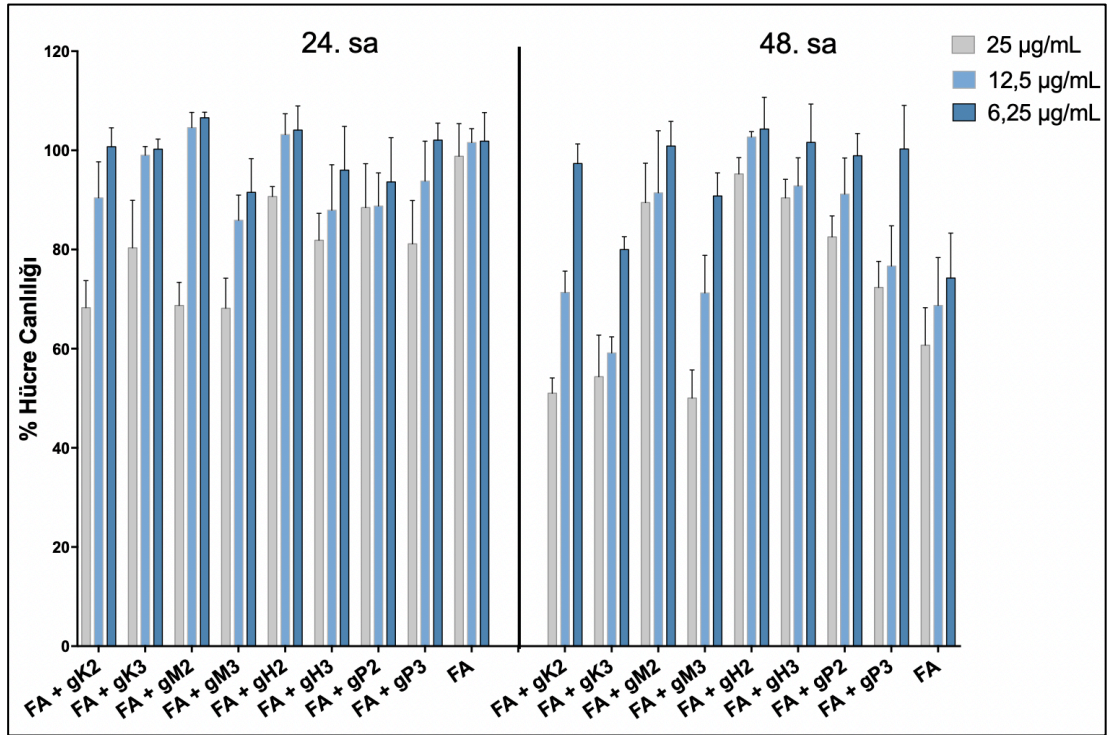
4.4.6. Hücre Canlılığı Çalışmaları

Boş kitosan jellere ve etkin madde yüklü (fusidik asit veya sodyum fusidat veya endolizin) jel formülasyonlarına ait 24. ve 48. saat % hücre canlılığı sonuçları Şekil 4.11– 14. 'te gösterilmiştir.

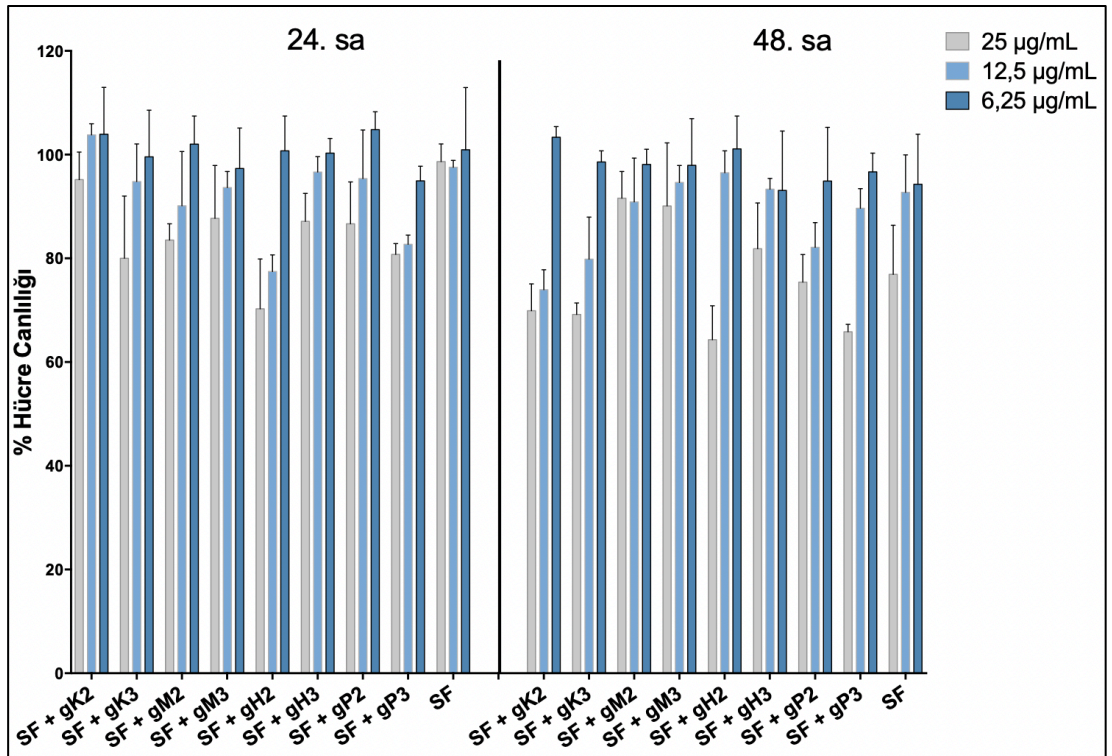
Boş kitosan jellerin 24. ve 48. saatin sonunda hücre canlılığının %80'nin üzerinde olduğu , kitosanın moleküler ağırlığı ve konsantrasyonundaki değişikliğin hücre canlılığı üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Hücre canlılığı çalışmaları için beş farklı konsantrasyon (6,25-25 µg/mL) seçilmiş olup artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Ancak antibakteriyel aktivite gösterdikleri konsantrasyon göz önüne alındığında, bu konsantrasyonda (6,25 µg/mL) hücre canlılığı üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür.



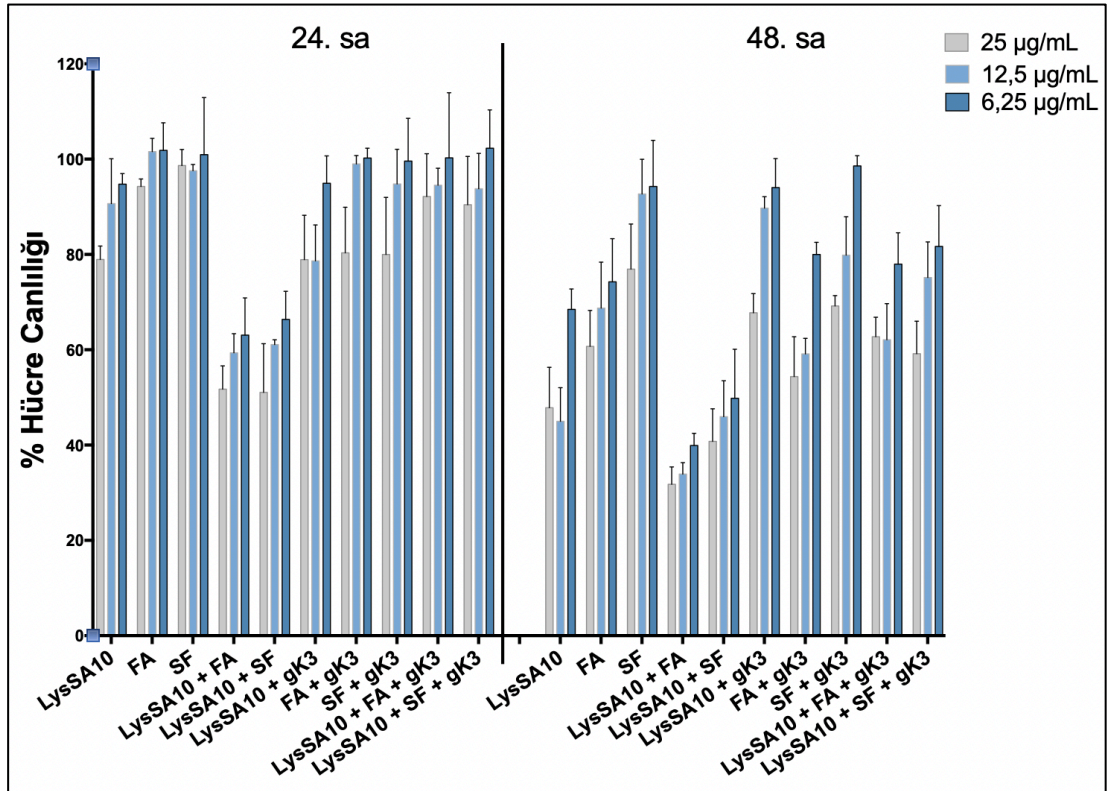
Şekil 4.11. Kitosan jellere ait hücre canlılığı sonuçları.



Şekil 4.12. Fusidik asit içeren kitosan jellere ait hücre canlılığı sonuçları.



Şekil 4.13. Sodyum fusidat içeren kitosan jellere ait hücre canlılığı sonuçları.



Şekil 4.14. Endolizin, endolizin ve fusidik asit kombinasyonu, endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren kitosan jellere ait hücre canlılığı sonuçları.

Kitosan jellere etkin madde (fusidik asit veya sodyum fusidat) yüklendiğinde de hücre canlılığında önemli azalma gözlenmemiştir ($p>0,05$). Etkin maddelerin tek başına da hücrelerin canlılığına olumsuz etkisi olmamıştır. Benzer şekilde endolizinin tek başına ve endolizin yüklü koyo kitosan jel formülasyonunda da hücre canlılığı yüksek bulunmuştur.

Endolizin + fusidik asit ve endolizin + sodyum fusidat kombinasyonu incelendiğinde 24. ve 48. saatte hücre canlılığında azalma gözlemlenmiştir. Ancak endolizin + fusidik asit kombinasyonu ve endolizin + sodyum fusidat kombinasyonu kitosan jele inkorpore edildiğinde hücre canlılığında artış gözlenmiştir (Şekil 4.14.).

4.4.7. Geliştirilen Formülasyonların Özelliklerinin Karşılaştırılması

Geliştirilen tüm kitosan jel formülasyonların ve piyasa preparatlarının özellikleri Tablo 4.16. ve Tablo 4.17.'de özetlenmiştir. Viskozite yönüyle karşılaştırıldığında, fusidik asit ve sodyum fusidat için özellikle koyo kitosan (gK) ve orta molekül ağırlıklı kitosan (gM) ile hazırlanan formülasyonların viskozite değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Adezyon yönüyle özellikle orta molekül

ağırlıklı kitosan (gM) ile hazırlanan jellerin adezyonu daha yüksek bulunmuştur. Formülasyonlardan etkin maddelerin salımı değerlendirildiğinde, en yüksek salım koyo kitosan (gK) içinde hazırlanan sodyum fusidat içeren jel ile elde edilmiştir. Özellikle kitosan %3 konsantrasyonda kullanıldığında daha yüksek viskozite ve adezyon elde edilmiştir. Kitosanın konsantrasyonunun artmasıyla etkin maddenin salımının azaldığı görülmüştür. Antibakteriyel aktiviteleri incelendiğinde ise sodyum fusidat içeren jellerin MRSA4'e karşı daha etkili olduğu bulunmuştur. Şırınga edilebilirlik değerlerine bakıldığında, konulduğu kaptan rahat çıkmasını sağlayacak değerler koyo kitosan ve orta molekül ağırlıklı kitosan içinde hazırlanan sodyum fusidat ve fusidik asit formülasyonlarıyla elde edilmiştir.

Yapılan çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda, topikal olarak kolay uygulanabilecek kıvamda, uygulama bölgesinde daha uzun süre kalmasını sağlayacak adezyona sahip, uygun miktarda ilaç salımı sağlayan ve antibakteriyel aktivitesi yüksek olan aşağıda verilen formülasyonlar seçilmiştir:

- Koyo kitosan jel (%3) içinde hazırlanan sodyum fusidat formülasyonu (SF + gK3)
- Orta molekül ağırlıklı kitosan jel (%3) içinde hazırlanan sodyum fusidat formülasyonu (SF + gM3)
- Koyo kitosan jel (%3) içinde hazırlanan fusidik asit formülasyonu (FA + gK3)
- Orta molekül ağırlıklı kitosan jel (%3) içinde hazırlanan fusidik asit formülasyonu (FA + gM3)

Tablo 4.16. Jel formülasyonlarının ve fusidik asit içeren jellerin özelliklerinin karşılaştırılması.

	pH	Viskozite (cP±SS)	In vitro adezyon (N.sec/cm ² ±SS)	Zeta Potansiyel (mV±SS)	% Etkin Madde Salım Miktarı ± SS (6. Saat sonunda)	% Membranda Kalan ± SS (6.saat sonunda)	Şırınga edilebilirlik işisi (N.mm ± SS)	ATCC 43300 (MİK (µg/mL)	MRSA4 (MİK (µg/mL)
gK2	5	143,9	0,8 ± 0,1	66,5 ± 4	-	-	23,76 ± 3,09	9,77	9,77
gK3	5	537,4±2,6	1,1 ± 0,1	65,4 ± 1,3	-	-	25,16 ± 1,46	7,325	1,83
gM2	4	1961,2±54,8	2,3 ± 0,4	80 ± 1,7	-	-	23,88 ± 0,65	0,915	0,61
gM3	4	5000,7± 11,5	4,1 ± 0,1	75 ± 3,2	-	-	22,06 ± 2,53	1,144	1,83
gH2	4	2129,9±49,9	2,3 ± 0,3	69,2 ± 1,7	-	-	30,50 ± 2,62	1,22	0,765
gH3	4	6233,2±69,5	5,9 ± 0,6	71,1 ± 6,8	-	-	38,59 ± 5,19	0,9725	0,97
gP2	5	190,2±2,9	1 ± 0,2	59,9 ± 2	-	-	19,20 ± 1,67	7,33	2,44
gP3	5	701,1±2,9	1,3 ± 0,2	59 ± 3	-	-	23,48 ± 0,68	1,83	0,915
FA + gK2	5	133,9	1,1 ± 0,1	70,4 ± 1,5	19,50± 4,20	62,70 ± 7.0	26,63 ± 2,54	0,00715	0,0018
FA + gK3	5	540,7	1,4 ± 0,2	68,1 ± 1,2	19,20 ± 6,80	62,40 ± 3,60	31,87 ± 1,4	0,00715	<0,0006
FA + gM2	4	874,8±7,9	2,4 ± 0,3	75,4 ± 1,1	10,08 ± 0,22	85,36 ± 2,08	35,78 ± 1,92	0,0095	0,006
FA + gM3	4	4440,1±8,6	4,6 ± 0,6	76 ± 2,2	10,04 ± 0,54	85,27 ± 5,68	26,42 ± 2,34	0,0024	<0,0006
FA + gH2	4	886,8±2,8	2,7 ± 0,2	75,32 ± 0,6	13,35 ± 5,10	83,60 ± 0,80	40,31 ± 5,18	0,0015	<0,0006
FA + gH3	4	4140,78±94,7	4,02 ± 0,1	81,15 ± 1,5	10,30 ± 0,19	76,05 ± 4,27	34,71 ± 2,18	0,0048	<0,0006
FA + gP2	5	188,5	1 ± 0,3	70,50 ± 1,1	4,65 ± 0,20	92,70 ± 0,47	30,13 ± 2,58	<0,0006	<0,0006
FA + gP3	5	1938,1±2,9	1,1 ± 0,1	67,42 ± 1,1	4,48 ± 0,02	95,09 ± 0,80	28,31 ± 0,85	0,0048	<0,0006

Tablo 4.17. Sodyum fusidat içeren jel formülasyonlarının ve piyasa preparatlarının özelliklerinin karşılaştırılması.

	pH	Viskozite (cP±SS)	In vitro adezyon (N.sec/cm ² ±SS)	Zeta Potansiyel (mV±SS)	% Etkin Madde Salım Miktarı ± SS (6. Saat sonunda)	% Membranda Kalan ± SS (6.saat sonunda)	Şırınga edilebilirlik işi (N.mm ± SS)	ATCC 43300 (MİK (µg/mL)	MRSA4 (MİK (µg/mL)
SF + gK2	5	147,2± 2,9	0,8 ± 0,2	65,1 ± 1,1	43,94 ± 6,16	41,81 ± 3,70	22,05 ± 2,46	0,0048	0,0024
SF + gK3	5	876,45±2,9	1,2 ± 0,1	61,4 ± 0,9	46,36 ± 4,65	36,91 ± 5,40	22,53 ± 2,39	<0,0006	<0,0006
SF + gM2	4	1605,7±10,3	3 ± 0,6	65,4 ± 2	30,10 ± 5,55	21,48 ± 3,70	20,84 ± 1,72	0,0095	<0,0006
SF + gM3	4	4233,39±22,1	4,5 ± 0,2	52,8 ± 8,9	22,83 ± 3,13	32,45 ± 3,90	37,81 ± 3,46	0,009	<0,0006
SF + gH2	4	2983,2±26,5	3 ± 0,3	65 ± 5	10,75 ± 0,68	83,30 ± 1,90	23,28 ± 1,32	0,0048	<0,0006
SF + gH3	4	5989,6±7,2	3,1 ± 0,4	64,3 ± 0,6	10,30 ± 0,40	82,80 ± 1,60	24,37 ± 0,99	<0,0006	<0,0006
SF + gP2	5	239,8±2,8	1 ± 0,2	59,3 ± 2,3	4,46 ± 0,16	83,40 ± 1,96	23,50 ± 2,2	0,00715	<0,0006
SF + gP3	5	1969,5	1,1 ± 0,2	58,3 ± 3,1	4,17 ± 0,08	83,08 ± 1,30	23,63 ± 3,71	<0,0006	<0,0006
Fusidik asit içeren ticari krem	4	820,2 ±12,8	2,1±0,2	-8,8±0,4	18,80 ± 5,50	50,20 ± 7,90	61,28 ± 8,15	<0,0006	<0,0006
Sodyum fusidat içeren ticari merhem	4	3642 ±325,6	2,4±0,1	9,55±1,5	14,40 ± 3,20	48,20 ± 10,90	298,04 ± 9,3	0,076	0,153

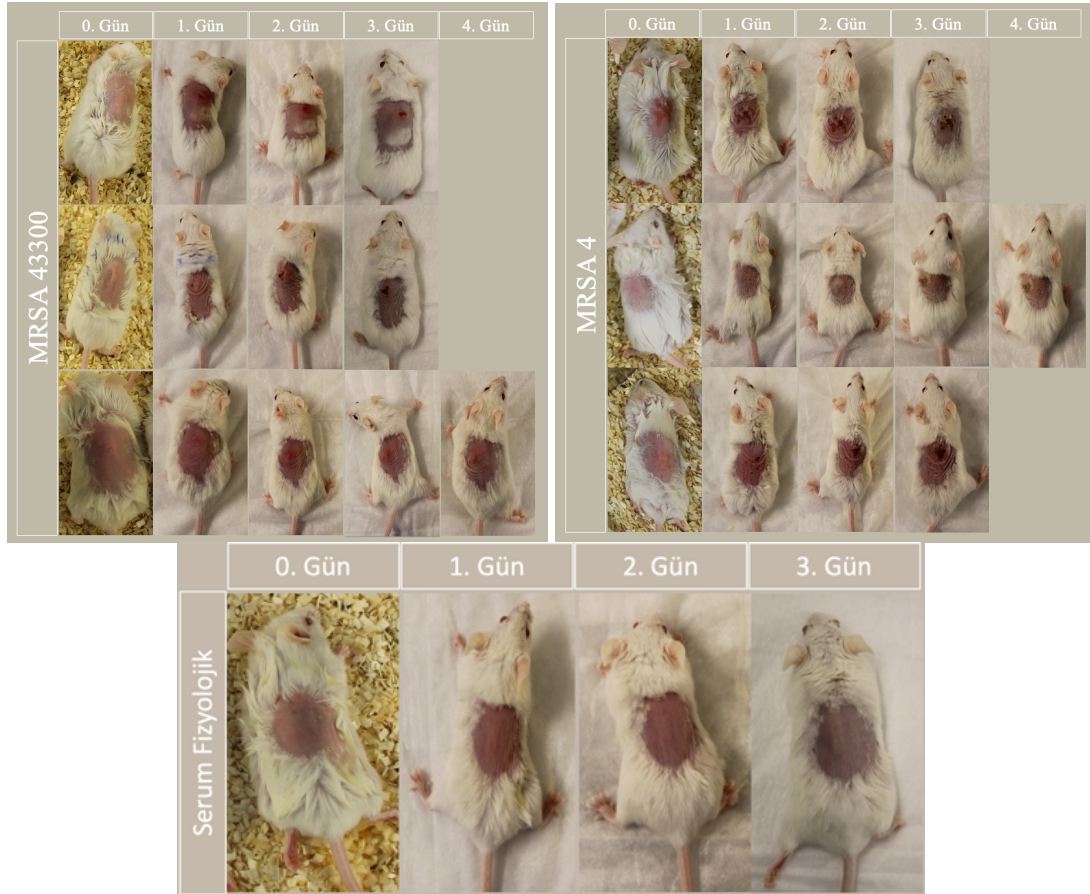
4.5. In Vivo Çalışmalar

4.5.1. Ön Çalışmalar

Çalışmalarımızda subkütanöz enjeksiyonla enfeksiyon oluşturma modeli seçilmiştir. Seçtiğimiz yara modelinin koşullarını (süre, doz, suş vb) teyit etmek amacıyla in vivo hayvan çalışmalarımızda ön çalışmalar yapılmış ve Balb/C farelerin sırtına 1×10^8 CFU/mL konsantrasyonda ATCC43300 ve MRSA4 bakteri inokulumu subkütanöz yolla enjekte edilmiştir (Şekil 4.15.). Subkütan enjeksiyon sonrasında lezyon oluşumu takip edilmiştir. Genel olarak 3 - 4 gün içinde yara lezyonunun oluşması beklenmektedir (265, 266). 3. günün sonunda hayvanlar sakrifiye edilmiştir. ATCC 43300 ve MRSA 4 ile enfekte gruptan birer hayvan takibi 4. güne devam ettirilmiştir. 3. günün sonunda ATCC 43300 ve MRSA4 uygulanan gruplarda açık yara ve/veya apse oluşumu gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda ise yara oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.16.).

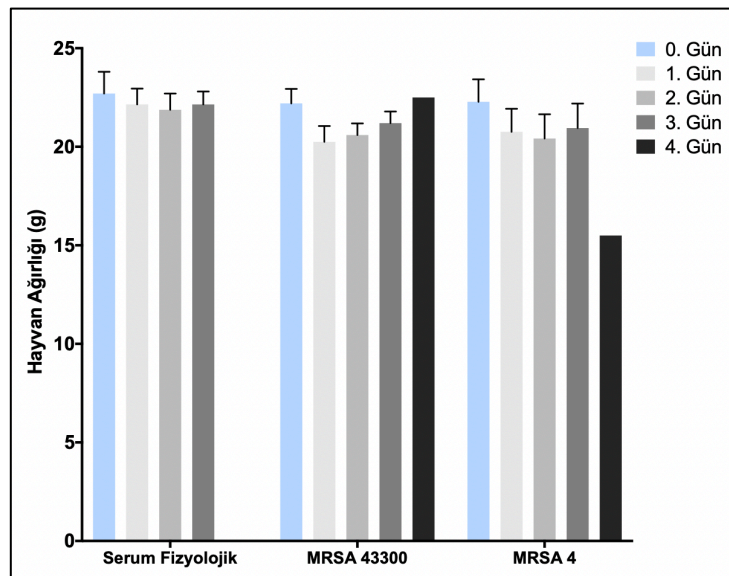


Şekil 4.15. Subkütan enjeksiyon.



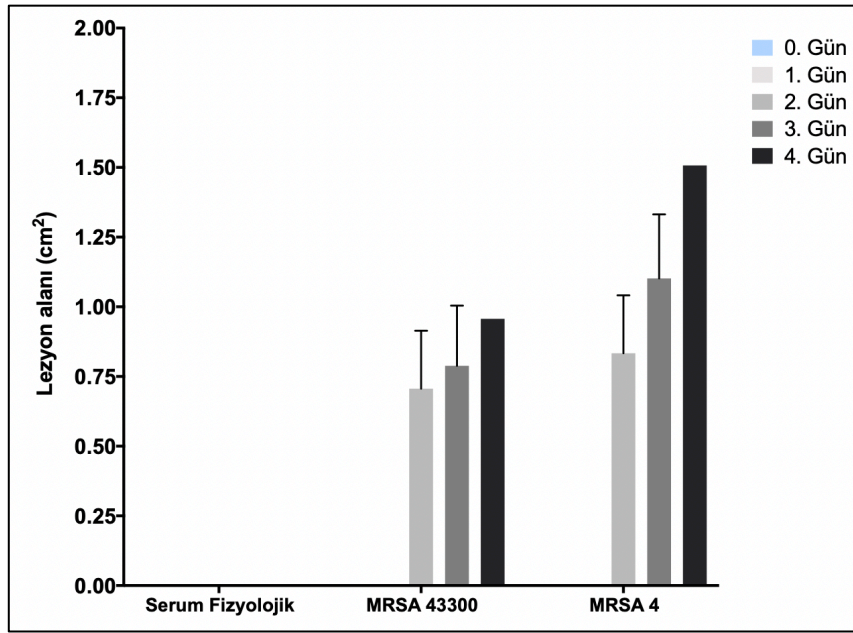
Şekil 4.16. ATCC 43300 ve MRSA4 ile enfekte edilen ve kontrol grubuna ait görüntüler.

3 ve 4. güne kadar hayvanların ağırlıklarında azalma olmamıştır ($p>0,5$) (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. Hayvan ağırlıkları (ön çalışmalar) (n=6).

3. gün ve 4. günde farelerin sırtında oluşan yara lezyon alanları incelendiğinde lezyonlarının enfekte edildikten sonraki 2. Günde oluşmaya başladığı görülmüştür (Şekil 4.16.). MRSA4 ile enfekte edilen gruplarda daha şiddetli ve daha kısa sürede enfeksiyon oluştuğu ve oluşan lezyon alanlarının daha geniş olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.18.).

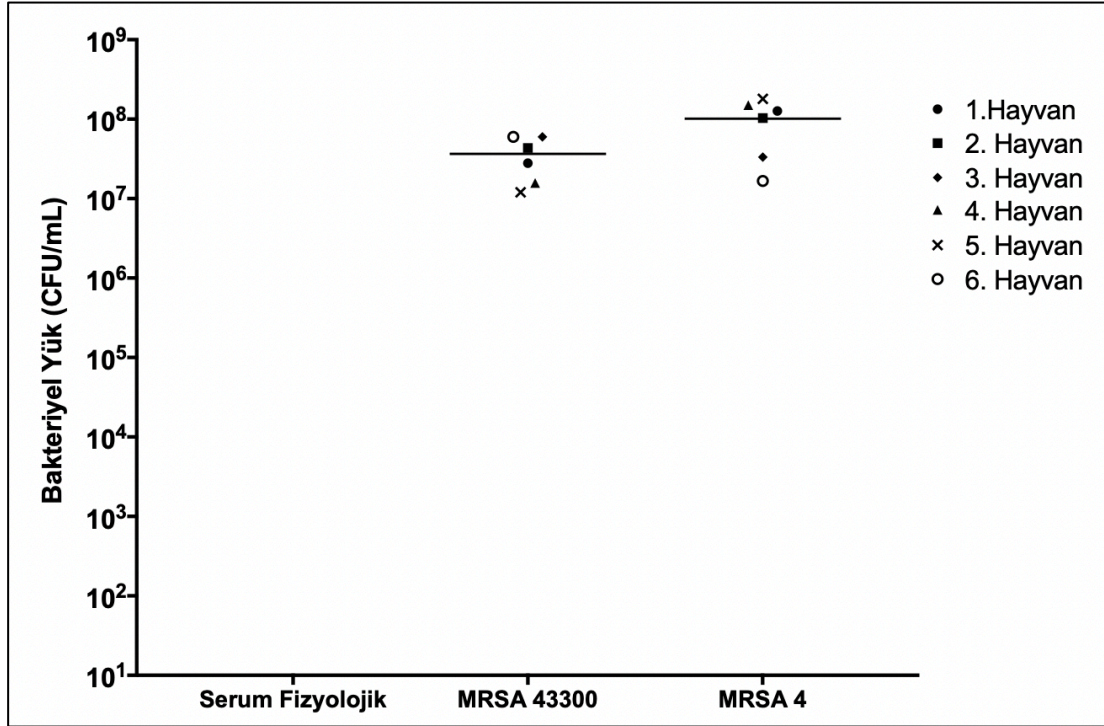


Şekil 4.18. Enfeksiyon sonrası oluşan lezyonların alanları.

Bakteriyel Yük Tayini

Hayvan gruplarına ATCC 43300 ve MRSA4 bakteri inokulumları 1×10^8 CFU/mL konsantrasyonda enjekte edilmiş ve enfekte edilen bölgede lezyon oluşumundan sonra bakteri sayısı (CFU/mL) tayin edilmiştir (Şekil 4.19.). Tüm çalışmalarda dokular homojenize edildikten sonra mannitol salt agar 'ya ekilerek koloni sayımıyla beraber bakteriyel yük tayin edilmiştir. Enfekte edilen gruplarda tayin edilen bakteriyel yük MRSA43300 için $3,65 \times 10^7$ CFU/mL ve MRSA4 için 1×10^8 CFU/mL olarak bulunmuştur. MRSA4 ile enfekte edilen dokularda enfeksiyon sonrası elde edilen bakteriyel yük ATCC43300 suşuna göre 10 kat daha fazla bulunmuştur.

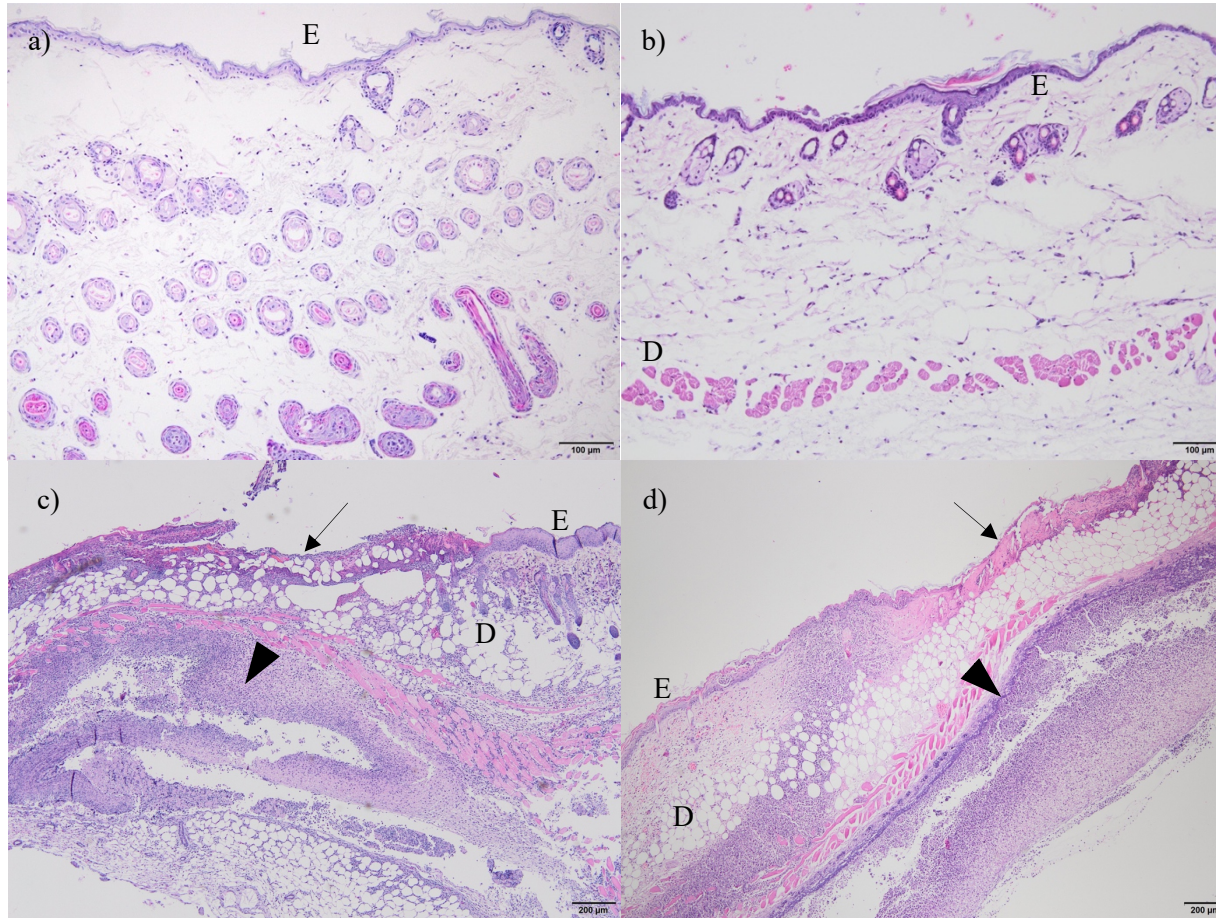
Ön çalışmalarımız sonucunda MRSA4 ile enfeksiyonun en uygun olduğu, ve uygulama konsantrasyonunun 1×10^8 CFU/mL olmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.19. Enfekte edildikten sonra 3.günde lezyonda canlı bakteri sayısı (CFU/mL).

Histopatolojik İnceleme

Kontrol grubunda ve iki farklı MRSA suşu ile enfekte edilen gruplarda oluşan değişiklikler 3. günün sonunda alınan doku örneklerinde histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Serum fizyolojik (kontrol) grubunda intakt dokuyla (Şekil 4.20a.) karşılaştırıldığında epidermis ve dermiste herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.20b.). Enfekte olan gruplarda ise apse oluşumu ve ülserasyon gözlemlenmiştir (4. 20c, d.).



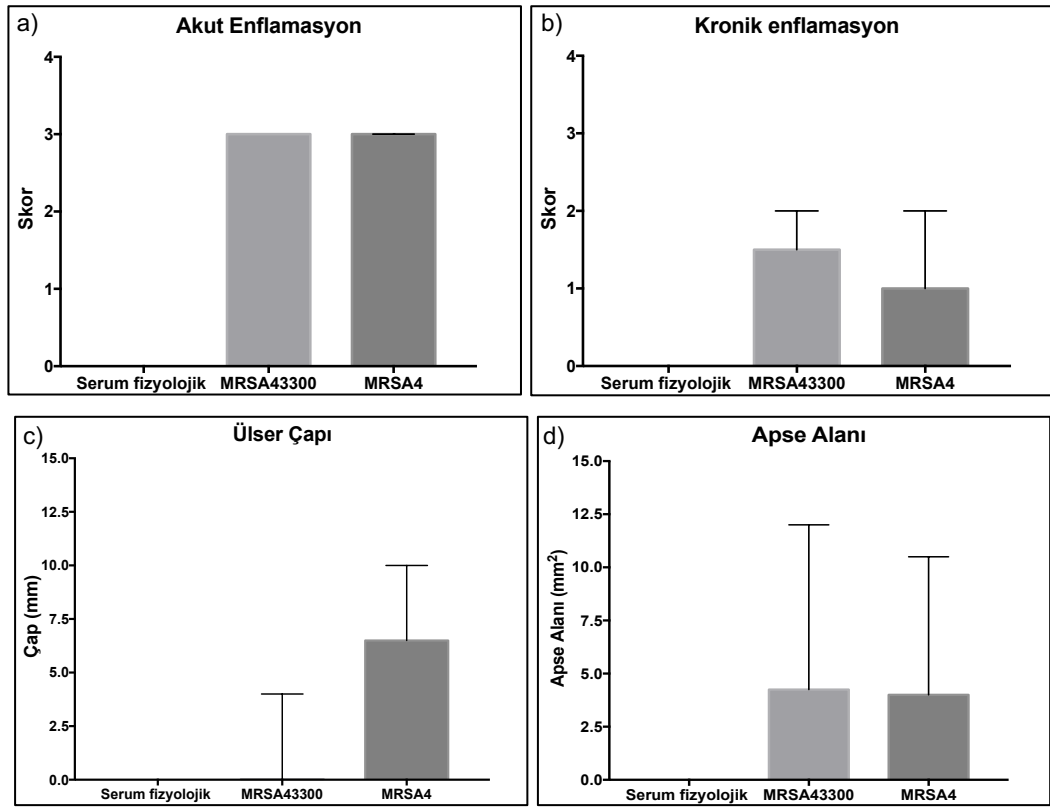
Şekil 4.20. Serum fizyolojik ve enfekte gruplarda 3. gündeki deriye ait histolojik kesitler (hemotoksilen ve eozin boyaması) intakt doku (a); serum fizyolojik uygulanmış doku (b); ATCC 43300 ile enfekte edilmiş doku (c) ve MRSA4 ile enfekte edilmiş doku (d) apse oluşumu (►) indüklenmiş ve MRSA4 ile enfekte tüm doku örneklerinde ülserasyon (→). E: epidermis, D: dermis.

ATCC 43300 ve MRSA4 ile enfekte gruplara ait histopatolojik değerlendirme Tablo 4.18.'de özetlenmiştir. İki farklı suşla enfekte olan gruplar arasında akut enflamasyon skoru, kronik enflamasyon skoru ve apse alanı arasında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ($p>0,5$) (Tablo 4.18.). MRSA 4 ve MRSA43300 bakteri suşlarının 3 gün içerisinde deride yüksek akut enflamasyon (skor=3) ve düşük kronik enflamasyon (skor=1) yanıtı oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak MRSA4 ile enfekte edilen grupta ülser çapı MRSA43300'e göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.21.). Çalışma sonucunda elde edilen ülser çapı kronik enflamasyonun göstergesi olarak değerlendirilmiştir. MRSA 4'e ait ülser çapının daha büyük bulunması bu suşun deride daha etkili bir enfeksiyon oluşturduğunu göstermiştir. Elde edilen histopatolojik sonuçlarla uyumlu olarak MRSA4 uygulanan gruplarda bakteriyel yük ve MPO aktivitesi daha yüksek elde edilmiştir. Bu sonuçlar MRSA4'ün daha şiddetli bir enfeksiyon oluşturduğunu teyit etmiştir. Enfekte gruplar birbiri içerisinde akut ve kronik enflamasyon yönüyle karşılaştırıldığında ise fark bulunmamıştır ($p>0,5$). MRSA 43300 ve MRSA4 suşları ile enfekte gruplarda ülser çapı değerlendirildiğinde, MRSA4 ile enfekte grupta ülser çapı MRSA43300 grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$), ancak apse alanı arasında fark bulunmamıştır ($p>0,5$).

Tablo 4.18. Enfeksiyon sonrası 3. güne ait histopatolojik değerlendirmeler.

Hayvan grubu	Hayvan Sayısı	Akut Enflamasyon Skoru	Kronik Enflamasyon Skoru	Reepitalizasyon Skoru		
				Ülser	Ülser Çapı (mm)	Apse Alanı (mm ²)
Serum fizyolojik (kontrol)	2	0	0	yok	0	0
MRSA43300	6	3	1,5	var	0,025	4,25
MRSA4	6	3	1	var	6,25	4,85
p*		>0,5	>0,5		<0,1	>0,5
p**		<0,05	<0,05		<0,05	<0,1

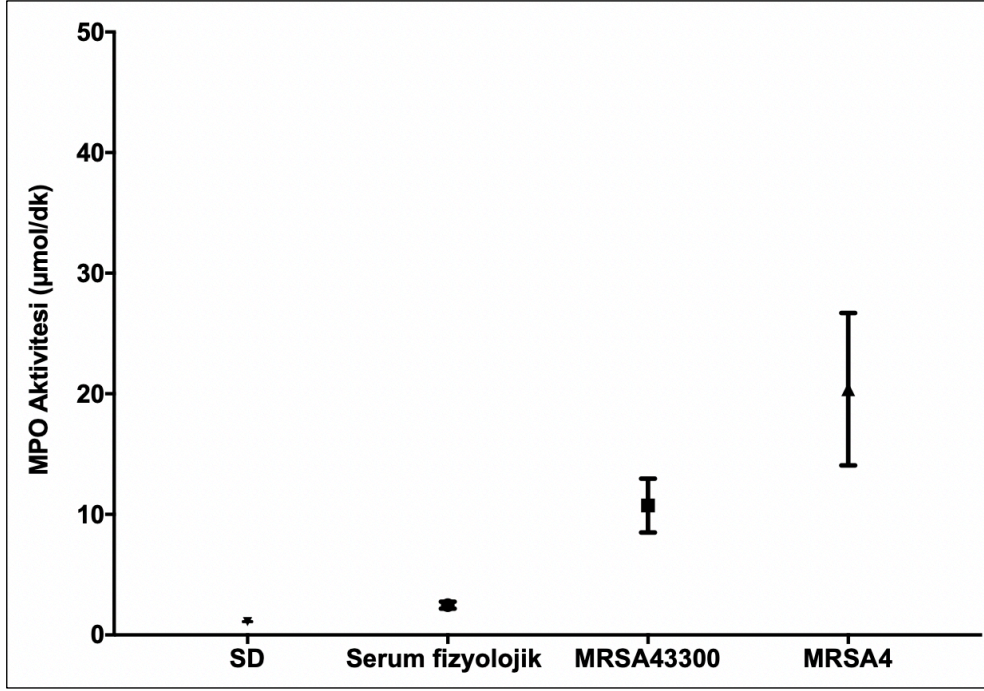
* Enfekte gruplar arasındaki fark , ** Enfekte gruplar ve serum fizyolojik arasında fark



Şekil 4.21. Histopatolojik değerlendirmeler: (a) Akut enflamasyon skoru; (b) Kronik enflamasyon skoru; (c) Ülser Çapı; (d) Apse alanı.

MPO Aktivitesi Tayini

3. güne güne ait deri örneklerinde tayin edilen MPO aktivitesi serum fizyolojik grubunda $2,47 \mu\text{mol/dk}$, MRSA43300 ile enfekte dokularda $10,74 \mu\text{mol/dk}$, MRSA4 ile enfekte grupta $20,38 \mu\text{mol/dk}$ olarak ölçülmüştür (Şekil 4.22.). MPO aktivitesi enfeksiyondan sonraki 3. günde MRSA43300 için 4,34 kat ve MRSA 4 için 8,25 kat artmıştır ($p < 0,1$). Serum fizyolojik grubu ile karşılaştırıldığında, ATCC 43300 ve MRSA4 için apse alanı sırasıyla $4,25 \text{ mm}^2$ ve $4,85 \text{ mm}^2$ elde edilmiş olup apse alanının oluşumu ile MPO aktivitesindeki artış ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4.22. Kontrol ve enfekte edilen deri örneklerinde enfekte edildikten 3 gün sonraki MPO aktivitesi.

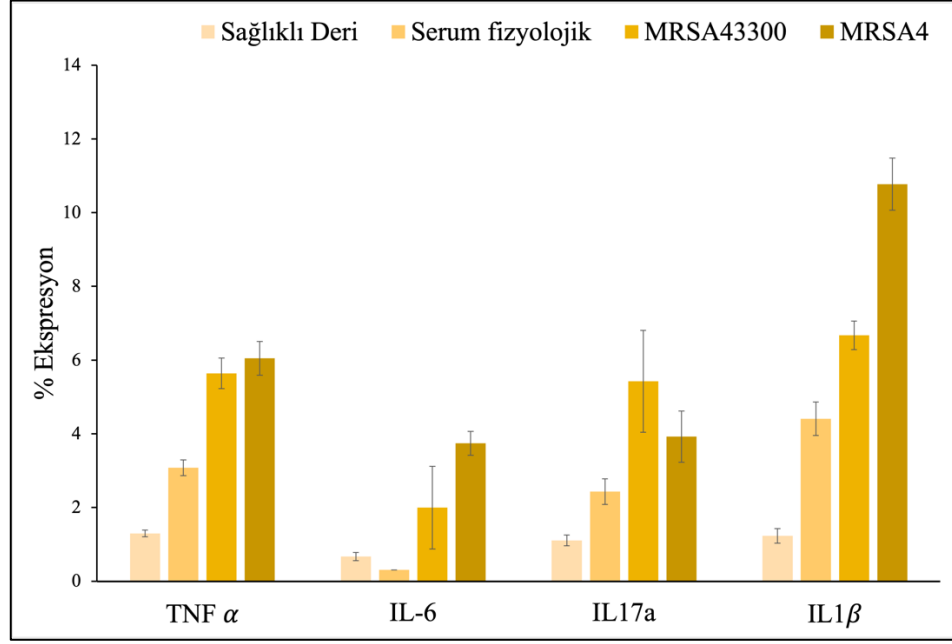
Ön çalışma sonuçlarına göre subkütan enjeksiyonla 1×10^8 CFU/mL da bakteri inokulumundan sonra 3 günde enfeksiyonun oluşturulduğu, yapılan analizlerde MRSA4 suşu ile , MRSA 43300'e göre daha kısa sürede yara oluşumu görülmüştür. Gerek oluşan lezyonların alanı gerekse MPO aktivitelerinde artış vee bakteriyel yükün artışı değerlendirildiğinde seçtiğimiz modelin ve seçtiğimiz koşulların uygunluğu teyit edilmiştir. Ön çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, enfeksiyon modelinde kullanmak için MRSA4 suşu seçilmiştir.

Sitokin düzeyleri tayini

Ön çalışmalarda kontrol (serum fizyolojik) ve MRSA 43300 ve MRSA4 ile enfekte gruplardan alınan deri örneklerinde tayin edilen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ ve $IL-17a$ düzeyleri Şekil 4.23.'te sunulmuştur. Enfekte olan gruplarda sitokin düzeylerinde başlangıç ve kontrole göre anlamlı artış görülmüştür. İncelenen iki suş arasında ise $TNF-\alpha$, $IL-6$ ve $IL-17a$ düzeylerinde fark bulunmamıştır. $IL-1\beta$ ekspresyon düzeyleri ise MRSA4 ile enfekte grupta diğer suşa göre daha yüksek bulunmuştur.

Tümör nekroz faktörü alfa ($TNF-\alpha$) enflamatuvar yanıtların başlıca düzenleyicisi olarak tanımlanan ve bazı enflamatuvar ve otoimmün hastalıkların

patogenezinde rol oynadığı bilinen ve apoptozu düzenleyen çok işlevli bir sitokindir (275, 276). TNF- α , özellikle nötrofilleri, makrofajları ve deriye özgü hafıza T hücrelerini düzenleyen geniş bir kemokin setini indükleyerek doğal bağışıklığı ve enflamasyonu düzenlemektedir (277). Hayvan modellerinde bozulmuş iyileşme (impaired healing) ve akut insan yaralarının yaşa bağlı gecikmiş iyileşmesi pro-inflamatuvar fenotipe paralel olabilecek artmış lokal ve sistemik TNF- α seviyeleri sergilemektedir. Yapılan çalışmalarda hem sistemik hem de akut yaralarda TNF α düzeylerinin, bozulmuş iyileşmeye yatkın insanlarda önemli ölçüde arttığını ve yükselmiş düzeylerinin iyileşmeyle paralel olarak azaldığını bildirilmiştir(278). Enfeksiyon durumunda TNF- α hızla salınarak yara dokularında enflamasyonu başlatmakta olup TNF- α 'nın yara iyileşmesinin erken sürecinde rol aldığı bildirilmiştir (279). Deri, dokuları yenileyerek ve kolajenli bir yara oluşturarak hasarlı veya kayıp dokuları onarma kapasitesine sahiptir. Bu sürece "yara iyileşmesi" adı verilir ve çeşitli sitokinlerin ve interlökin (IL-1 β), tümör nekroz faktörü (TNF- α), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi büyüme faktörlerinin üretildiği pıhtılaşma, enflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillendirme fazlarından oluşmaktadır(279). TNF- α ile birlikte IL-1 β , IL-6 ve epidermal büyüme faktörü (EGF) yara iyileşme sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Derinin yaralanmasında sonra keratinositlerden yara bölgesindeki nötrofillerin ve makrofajların göçünü ve çoğalmasını uyaran TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinleri de salgılanır (280). IL-17A, *S. aureus* deri enfeksiyonlarında birçok hücre tarafından üretilmektedir (281). Bu nedenle yara enfeksiyon modeli oluştururken enfeksiyonun oluşumunu ve şiddetini belirlemek için TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-17A sitokin düzeyleri incelenmiştir. MRSA43300 ve MRSA4 ile enfekte gruplardaki sitokin düzeyleri başlangıç ve kontrole göre artış göstermiş ve bu suş arasında yalnızca IL-1 β düzeylerinde MRSA4 ile enfekte grupta daha yüksek elde edilmiş olup daha şiddetli enfeksiyon oluşmuştur.

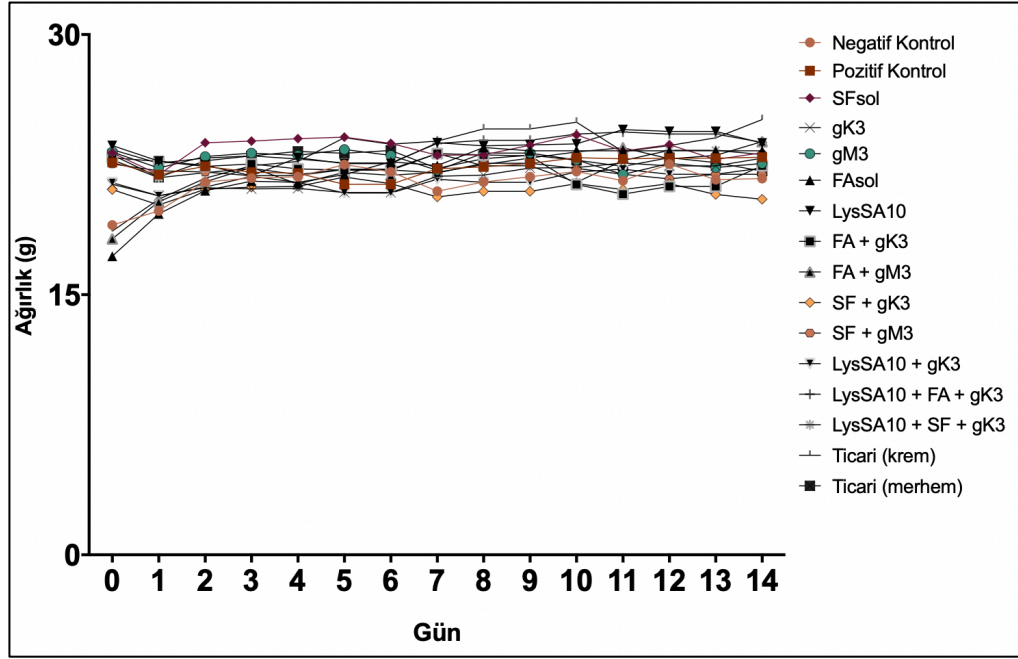


Şekil 4.23. Ön çalışmalarda 3. günde alınan deri örneklerindeki sitokin düzeyleri (3. gün).

4.5.2. Formülasyonlarla Yapılan Çalışmalar

Ön çalışmalarımızla teyit ettikten sonra, çalışmalarımızda geliştirdiğimiz formülasyonların in vivo etkinliği göstermek amacıyla subkütanöz enjeksiyon ile yara oluşturulan fareler kullanılmıştır.

Formülasyonların uygulaması enfekte edildikten sonra 4. günde başlatılmış olup 9. güne kadar 5 gün boyunca (9. günde uygulama yapılmamıştır, uygulama yapılan günler 4., 5., 6., 7., ve 8. gündür, 9. günün sabahı kontrol edilerek sakrifikasyon uygulama yapılmadan önce yapılmıştır.) günde 2 kez olmak üzere 8 saat arayla uygulama yapılmıştır. 9. günde iyileşme gözlenen hayvanlar sakrifiye edilip gruplarda iyileşmenin tamamlanmadığı hayvanlar enfeksiyon sonrası 11. güne kadar takip edilerek uygulamaya devam edilmiştir. Deney süresi boyunca tüm uygulama gruplarında hayvan ağırlıklarında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($p>0,5$) (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Deney süresince hayvan ağırlığındaki değişimin takibi.

Fusidik Asit İçeren Jel Formülasyonları

Kontrol ve uygulama gruplarında formülasyon uygulama öncesi (0, 1, 2 ve 3. gün) ve sonrası (4 - 14. gün) lezyonları görüntüleri Şekil 4.25'te verilmiştir. Enfekte edilen tüm gruplarda 2. günden itibaren apse/açık yara oluşumu başlamıştır.

Lezyon alanı ve iyileşmesi

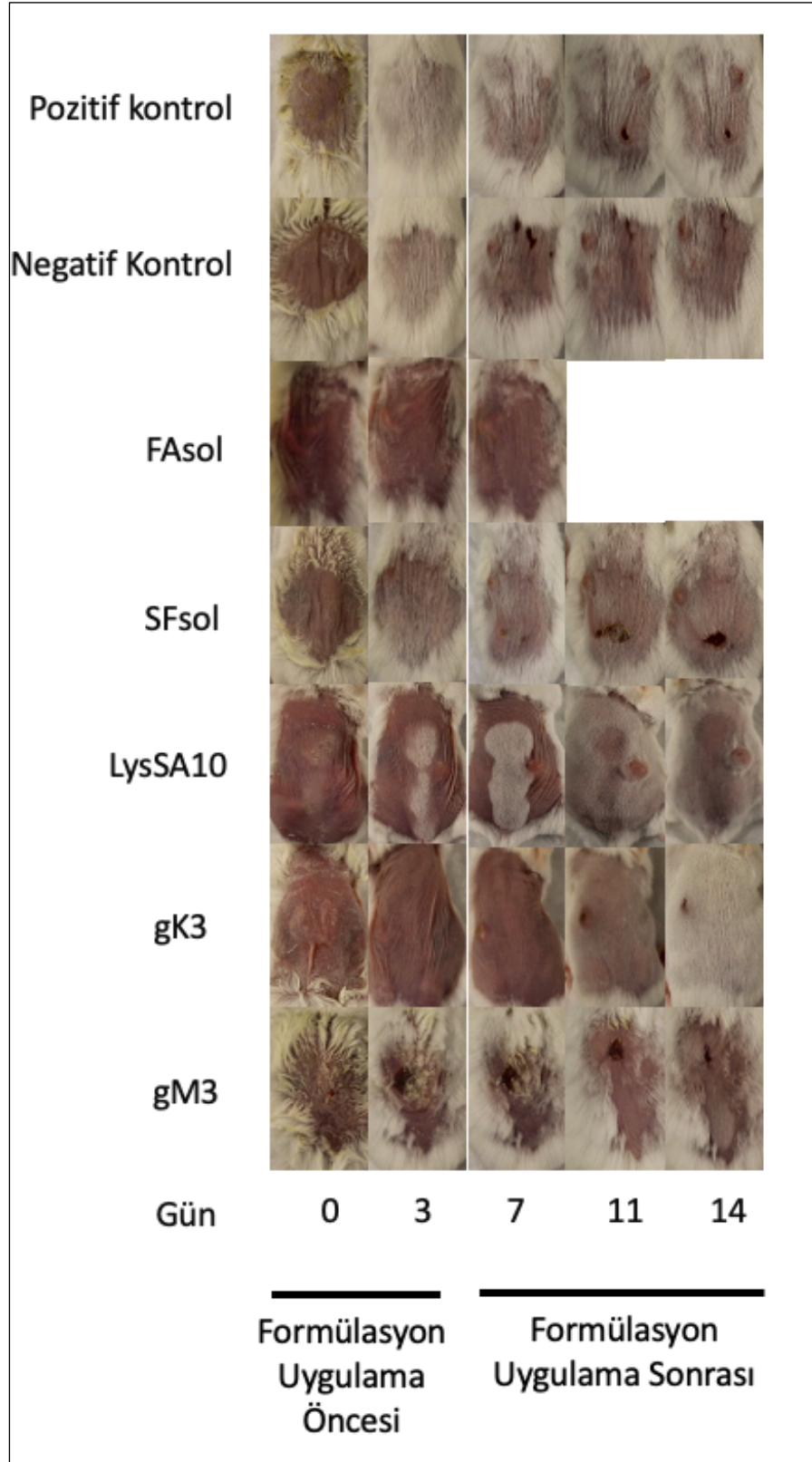
Formülasyon uygulaması yapılmayan enfekte grupta takip edilen 14 gün boyunca oluşturulan oluşan yaranın iyileşmediği görülmüş olup (Şekil 4.25.). lezyon alanlarında da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmemesi ($p>0,5$) bunu destekler niteliktedir. Formülasyonlarda hem taşıyıcı olarak hem de antibakteriyel aktivitesi nedeniyle seçilen kitosanı içeren jeller (Koyo kitosan jel-gK3 ve orta molekül ağırlığına sahip kitosan jel-gM3) tek başına uygulandığında enfeksiyon sonrası 11. günde (Gün 14) yaranın iyileştiği gözlemlenmiştir. Boş kitosan jellerin lezyon alanına etkisi incelendiğinde koyo kitosan jelin lezyon alanının kontrol grubuna daha az olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Orta molekül ağırlıklı kitosan jel uygulanan grupta lezyon alanında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Etkin madde olarak seçilen fusidik asit tek başına çözelti (FAsol) olarak uygulandığında ise iyileşme enfeksiyon sonrası 6. günün sonunda tamamlanmıştır. Bu grupta enfeksiyon sonrası 6. günün sonunda lezyon alanında pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$).

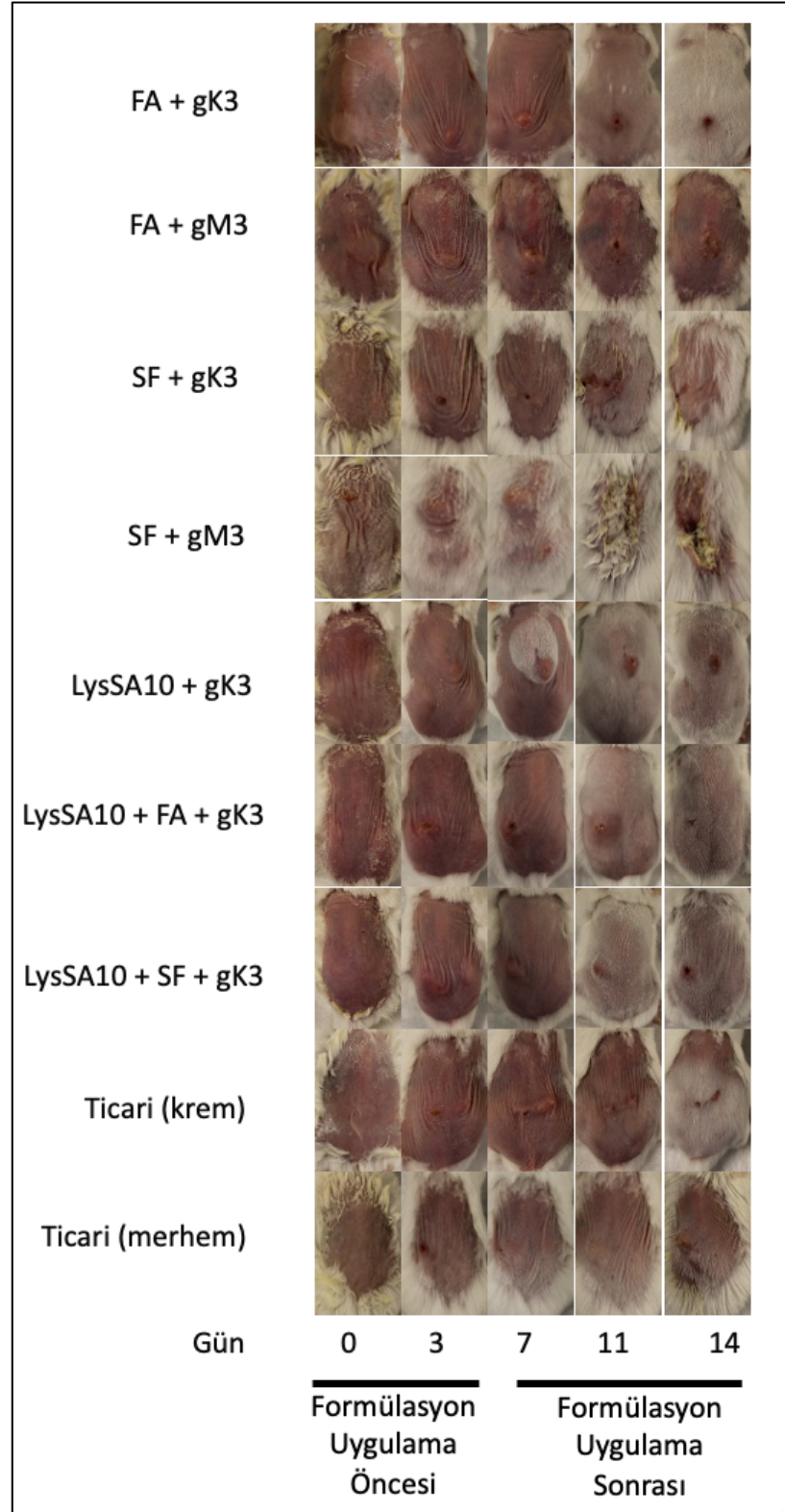
Koyo kitosan jel içinde hazırlanan fusidik asit formülasyonu (FA+gK3) uygulanan gruplarda enfeksiyon sonrası 5. günün sonunda iyileşmeye başladığı, enfeksiyon sonrası 8. günden sonra lezyon alanının neredeyse tamamen kapandığı, enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda lezyon alanında anlamlı bir azalma olduğu ($p<0,05$), orta molekül ağırlıklı kitosan jel ile hazırlanan formülasyonda (FA + gM3) ise enfeksiyon sonrası 10. günün sonunda lezyon alanının iyileştiği ve enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda lezyon alanında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.26.). Fusidik asit içeren %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel (FA + gK3) uygulanan gruplara ait MPO aktivitesi $1,9 \mu\text{mol/dk}$ ve apse alanı $2,75 \text{ mm}^2$ elde edilmiş olup yaranın iyileştiğini göstermektedir. Fusidik asit içeren %3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jel (FA + gM3) uygulanan grupta yaranın daha hızlı iyileştiği gözlemlenmiştir.

Fusidik asit içeren ticari krem uygulanan grupta ise yaranın tam kapanmadığı görülmüş olup lezyon alanında pozitif kontrole göre azalma görülmemiştir. Geliştirdiğimiz formülasyonun yara iyileşmesinde daha etkili olabileceğini göstermiştir. Fusidik asitin koyo kitosan jel varlığında (FA + gK3) lezyonları daha hızlı iyileştiği görülmüştür.

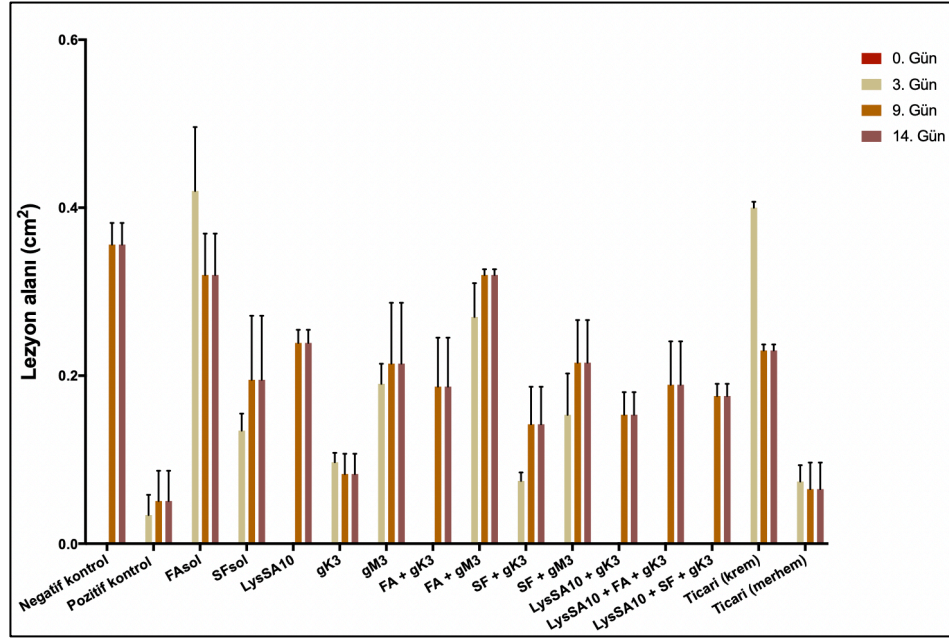
Boş %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel (gK3) ve %3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jel (gM3) uygulanan gruplarda iyileşme enfeksiyon sonrası 5. günün sonunda başlamıştır. Apsel alanı her iki jel formülasyonu için 5 mm^2 elde edilmiş olup formülasyon gruplarıyla (FA + gK3 ve FA + gM3) karşılaştırıldığında apsel alanının daha geniş olduğu görülmektedir. Etkin madde içeren formülasyonların taşıyıcı jellere göre daha etkili olduğu görülmüştür.



Şekil 4.25. Kontrol ve enfekte gruplarda makroskopik görüntüler.



Şekil 4.26. Jel formülasyonları ve ticari ürün gruplarına ait makroskopik görüntüler.



Şekil 4.27. Kontrol ve enfekte olan gruplarda formülasyon uygulama öncesi (0-3.gün) ve sonrası (4-14.gün) sırt derisindeki lezyon alanları.

Histopatolojik inceleme

Kontrol grupları ve formülasyon uygulanan gruplara ait deri örnekleri histopatolojik olarak değerlendirilmiş olup lezyonlara ait histoloji Şekil 4.28.'de, histopatolojik değerlendirme skorları Tablo 4.19.'da verilmiştir. Pozitif kontrol grubuna ait enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda alınan deri örneklerinde olan enfekte grupta ülserasyon ve akut enflamasyon gözlenmiş olup enflamatuvar hücre infiltrasyonu ile apse oluşumunun indüklendiği görülmüştür (Şekil 4.28b.).

Histopatolojik skorlar değerlendirildiğinde, gerek kitosan tek başına gerekse formülasyon uygulanan gruplarda akut enflamasyon skorunda enfeksiyon sonrası 11. Günde anlamlı bir azalma görülmüştür (Tablo 4.19.). Kronik enflamasyon skorları değerlendirildiğinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir, enfeksiyon sonrası 6. Günün sonunda uygulama yapılan gruplarda (boş kitosan jel ve etkin madde içeren jel) kronik enflamasyon skorunda azalma gözlenmiştir.

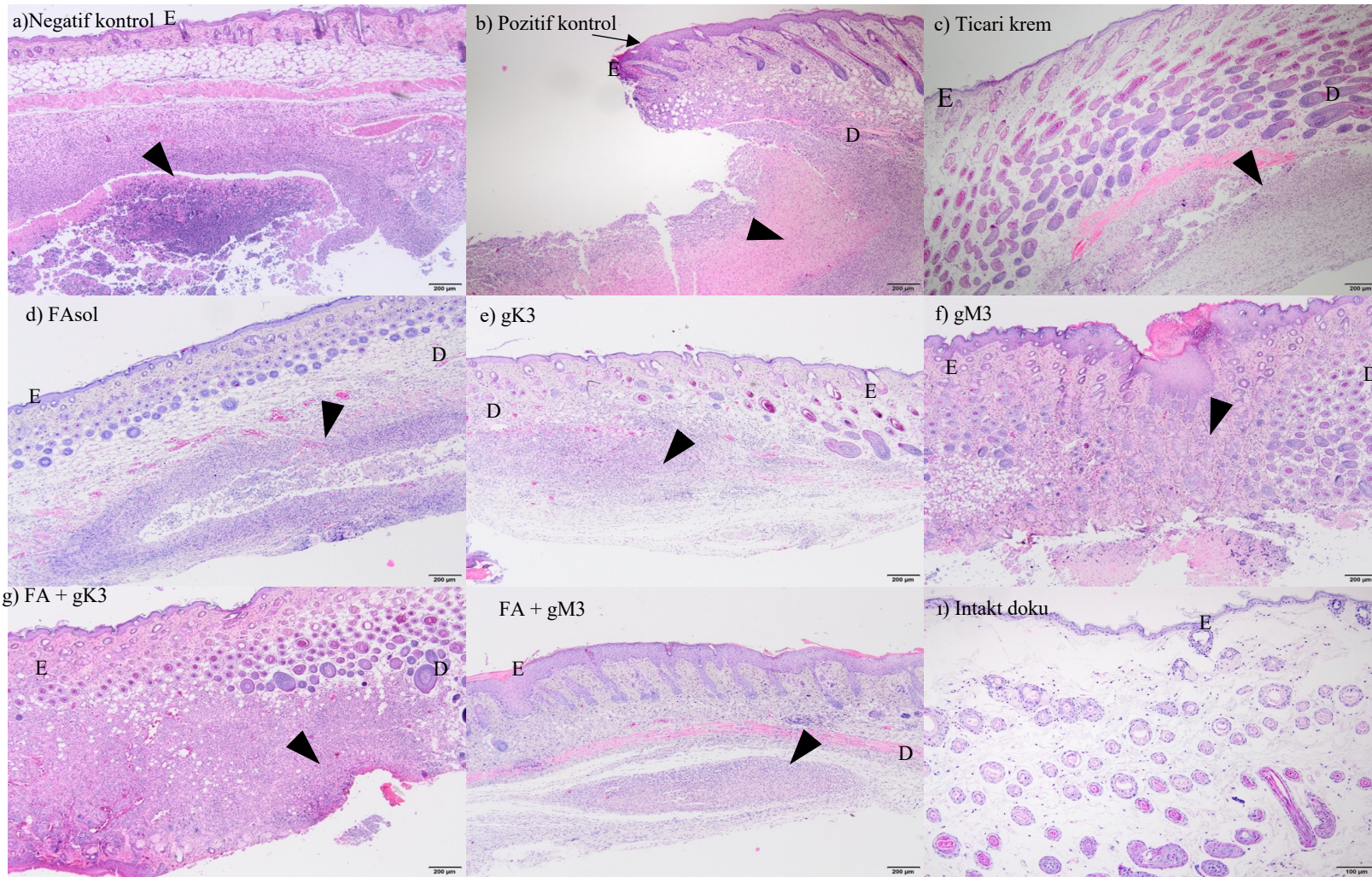
Tablo 4.19. Histopatolojik değerlendirme.

Grup	Akut enflamasyon skoru	Kronik enflamasyon skoru	Reepitalizasyon Skoru		
			Ülser Ülser Çapı (mm)	Apse alanı (mm ²)	
Sağlam deri	0	0	Yok	-	-
Negatif Kontrol	2	2,6	Yok	-	2,58
Pozitif kontrol	3	2,57	Var	1,67	8,00
FA sol**	1,4	1,2	Yok	-	4,90
SF sol	2,8	2,8	Yok	-	3,9
LysSA10	1,4	2,4	Yok	-	2,2
gK3	0,5	1,44	Yok	-	0,66
gM3	1,8	1,83	Yok	-	3,66
FA + gK3	1,1	1,4	Yok	-	1,9
FA + gM3	2	2,3	Yok	-	2,15
SF + gK3	0,8	1,33	Yok	-	0,86
SF + gM3	1	1,8	Yok	-	1
LysSA10 + gK3	0	1,6	Yok	-	0
LysSA10 + FA + gK3	0,8	1,4	Yok	-	0,75
LysSA10 + SF + gK3	1	1,4	Yok	-	0,5
Fusidik asit içeren ticari krem	1,4	2	Yok	-	2,70
Sodyum fusidat içeren ticari merhem	2,2	2	Yok	-	3,85

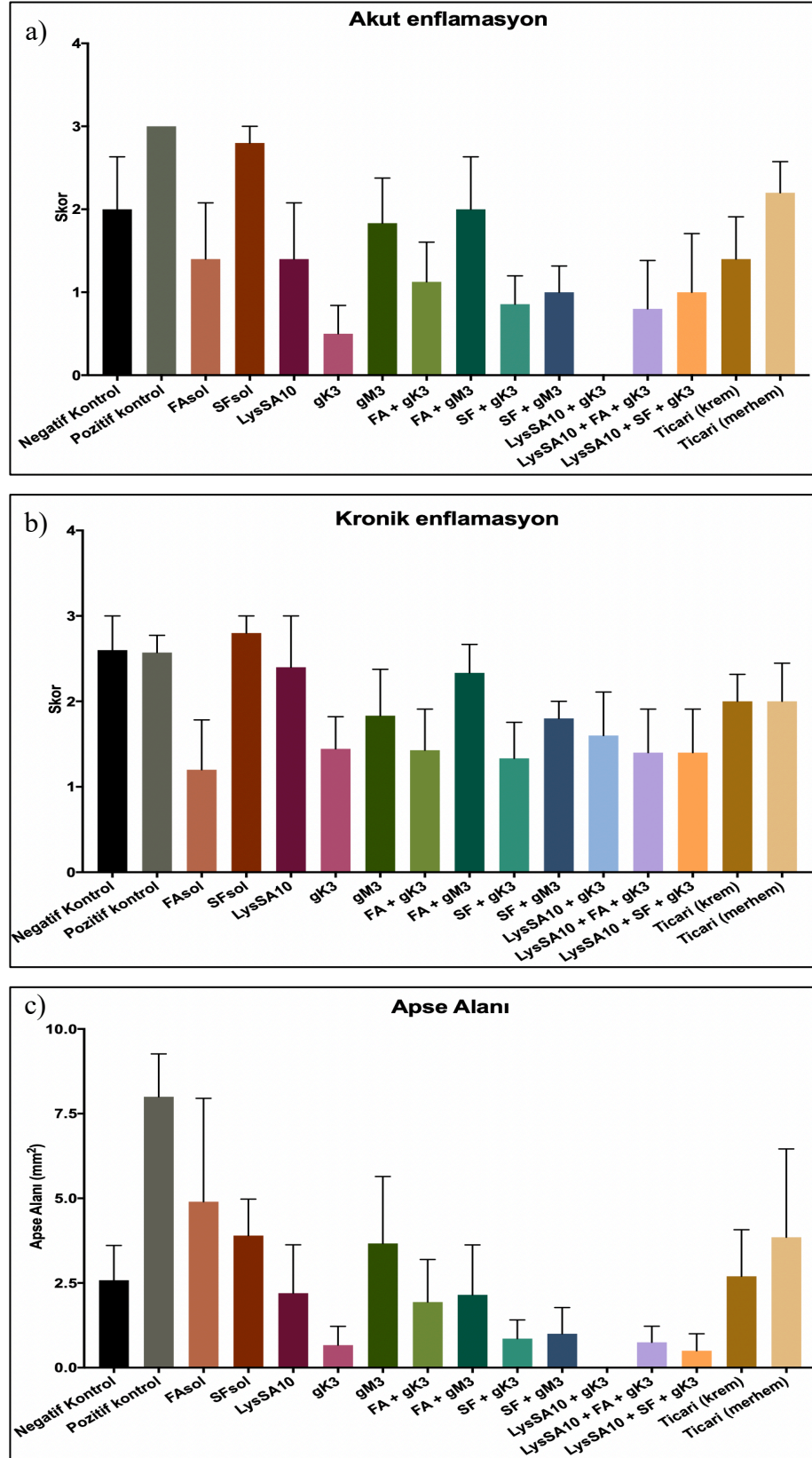
** enfeksiyon sonrası 6. Günün sonunda sakrifiye edilmiştir

Apse alanları incelendiğinde pozitif kontrol grubuna göre uygulama yapılan gruplarda apse alanında azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.28. ve Şekil 4.29.).

Genel olarak akut ve kronik enflamasyon yönüyle incelendiğinde koyo kitosan jel içinde hazırlanan fusidik asit formülasyonu (FA+gK3), fusidik asit içeren ticari kreme göre yara iyileşmesinde daha etkili olduğu görülmüştür.



Şekil 4.28. Enfeksiyon sonrası 11. Gün (Gün 14) sonunda lezyonların histopatolojisi (a) negatif kontrol, (b) pozitif kontrol, (c) fusidik asit içeren ticari krem, (d) fusidik asit çözeltisi (FAsol), (e) %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel (gK3), (f) %3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jel (gM3), (g) Fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3), (h) fusidik asit içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (FA + gM3), (i) intakt doku ülserasyon (ok →), ve apse oluşumu (ok ucu ►) E: Epidermis, D:Dermis.

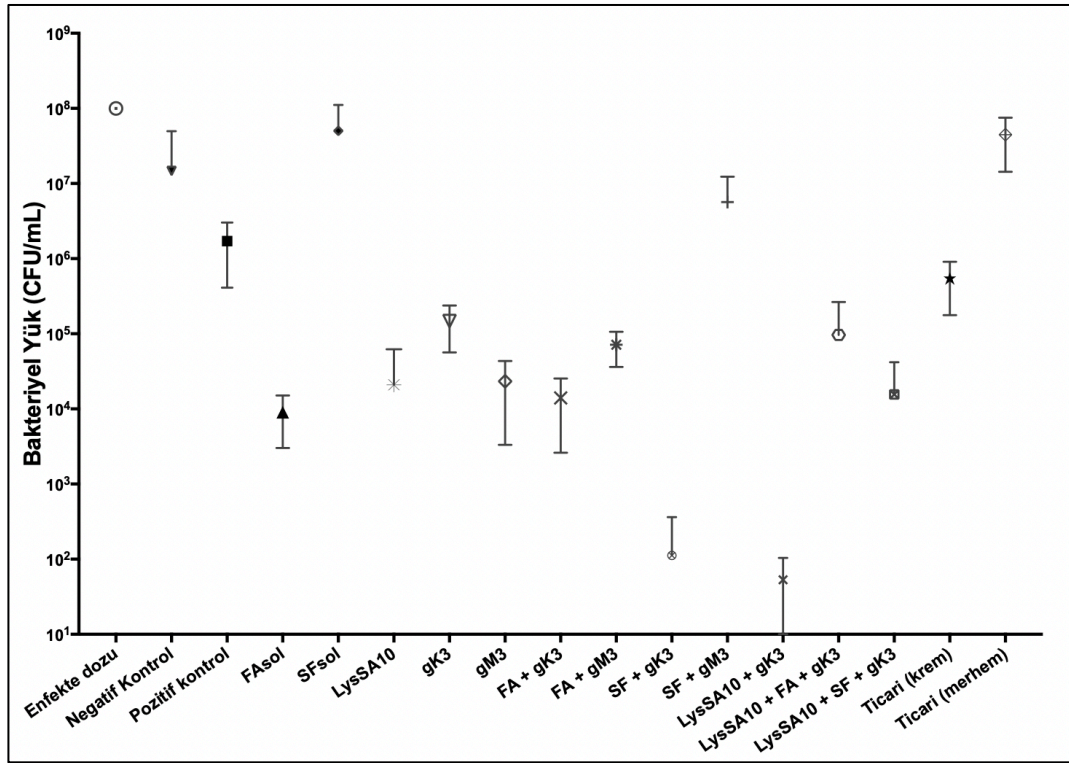


Şekil 4.29. Histopatolojik değerlendirme, a) akut enflamasyon, b) kronik enflamasyon, c) apse alanı.

Bakteriyel yük

Uygulama öncesi ve sonrası tayin edilen deri örneklerindeki bakteriyel yük sonuçları Şekil 4.30.'da gösterilmektedir. Pozitif kontrol grubunda enfeksiyon sonrası 11. Günün (Gün 14) sonunda deri örneklerindeki bakteriyel yük $1,7 \times 10^6$ CFU/mL olarak saptanmıştır.

Fusidik asit çözeltisi (FAsol) uygulanan gruplarda enfeksiyon sonrası 6. günün sonunda bakteriyel yük 9×10^3 CFU/mL olup, pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0,05$). Kitosan jel tek başına ve fusidik asit içeren jeller uygulanan gruplarda bakteriyel yükte anlamlı bir azalma görülmüş olmakla birlikte ($p < 0,5$), gruplar arasında fark bulunmamıştır. Geliştirmiş olduğumuz formülasyonlarla fusidik asit içeren krem arasında bakteriyel yükte fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

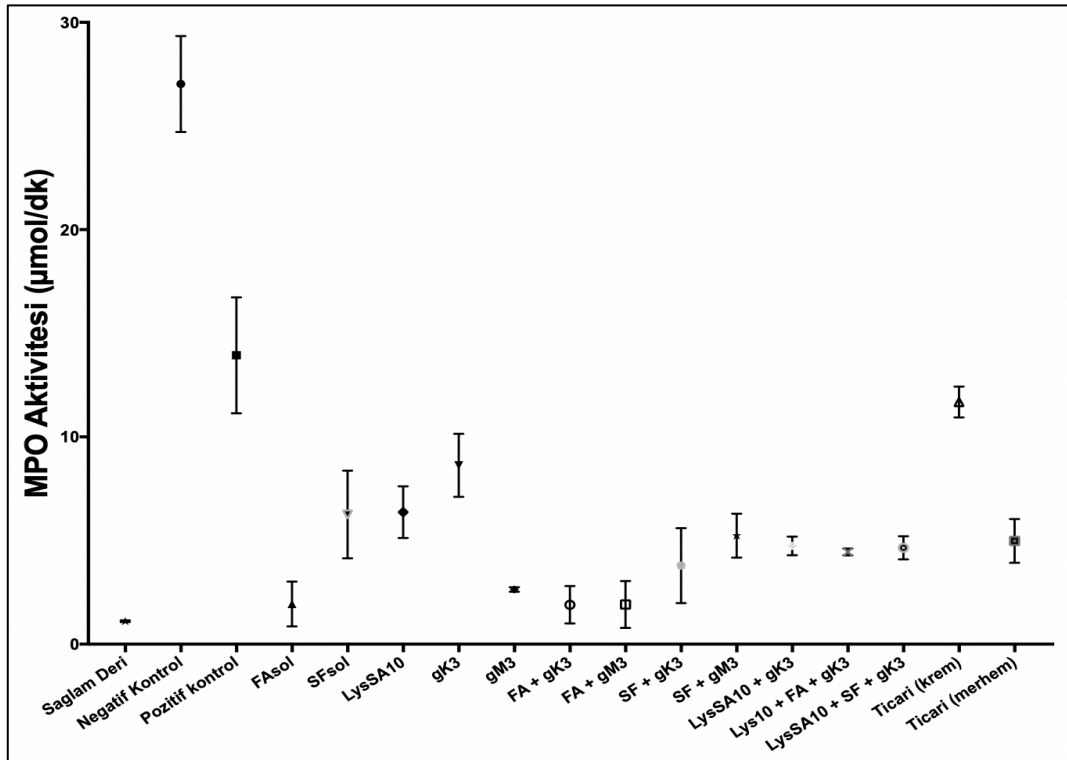


Şekil 4.30. Formülasyon uygulanan ve kontrol gruplarda derideki enfeksiyon sonrası 11. gün ait bakteriyel yük sonuçları. *FAsol grubu uygulanan hayvanlar enfeksiyon sonrası 6. gün sonunda sakrifiye edilmiştir.

MPO aktivitesi

Kontrol grubu ve formülasyon uygulanan gruplardan alınan deri örneklerinde ölçülen MPO aktivitesi sonuçları Şekil 4.31.'de verilmiştir. Pozitif kontrol grubu için enfeksiyon sonrası 11. günün sonunda MPO aktivitesi $13,94 \pm 4,8$ $\mu\text{mol/dk}$ olarak bulunmuştur.

Gerek fusidik asit tek başına gerekse jel formülasyonu içinde uygulandığında MPO aktivite değerlerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Boş jellerinde MPO aktivitesi ($8,63 \pm 2,6$ $\mu\text{mol/dk}$) pozitif kontrole göre düşük bulunmakla birlikte, etkin madde inkorpore edildiğinde aktivitenin ($1,94 \pm 1,06$ $\mu\text{mol/dk}$) daha da azaldığı görülmüştür (Şekil 4.31.). Farklı kitosanlar ile geliştirilen jel formülasyonları arasında ise MPO aktivitesinde fark bulunmamıştır. Fusidik asit içeren ticari kreme ait MPO aktivitesi ($11,68 \pm 1,28$ $\mu\text{mol/dk}$) pozitif kontrole yakın olup, geliştirdiğimiz formülasyonla karşılaştırdığımızda ise aradaki fark anlamlı bulunmuştur.



Şekil 4.31. Kontrol grubu ve formülasyon uygulanan deri örneklerinde 14.güne ait MPO aktivitesi. (*FAsol grubu uygulanan hayvanlar enfeksiyon sonrası 6. günün sonunda sakrifiye edilmiştir).

Sitokin düzeyi

Kontrol grubu ve fusidik asit içeren jel formülasyonları uygulanan gruplardan alınan deri örneklerinde tayin edilen TNF α , IL-1 β , IL-6 ve IL-17a düzeyleri Şekil 4.32.'de sunulmuştur.

TNF- α düzeyleri

Pozitif kontrol grubunda TNF- α düzeylerinde başlangıç değerine göre anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.32a.). Fusidik asit çözeltisi (FAsol) uygulanan hayvan grubunda pozitif kontrol grubuna göre TNF α ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte koyo kitosan jel (gK3) ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel (gM3) uygulanan gruplarda pozitif kontrol grubuna göre TNF α ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma yara enfeksiyonunun şiddetinin ve enflamasyonun azaldığını iyileşmenin olduğunu göstermektedir. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3) ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel (FA + gM3) formülasyonları uygulanan gruplarda TNF α ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Fusidik asit içeren jellerin boş kitosan jellere göre TNF α ekspresyon düzeyleri daha az elde edilmiş olup boş jellere göre daha etkili olduğu görülmüştür. Fusidik asit içeren ticari krem uygulanan grupta pozitif kontrol grubuna göre TNF α ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

IL-6 düzeyleri

Pozitif kontrol grubunda IL-6 düzeylerinde başlangıç değerine göre anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.32b.). Fusidik asit çözeltisi (FAsol) uygulanan hayvan grubunda pozitif kontrol grubuna göre IL-6 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuç TNF- α ekspresyonu ile benzer bulunmuştur. Ayrıca koyo kitosan jel (gK3) ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel (gM3) uygulanan gruplarda pozitif kontrol grubuna göre IL-6 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Boş kitosan jellerin enflamasyonu azalttığı ve yara iyileşmesinde etkili olduğu görülmüştür.

Fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3) ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel (FA + gM3) formülasyonları uygulanan gruplarda IL-6 ekspresyon düzeylerinde

anlamli bir azalma gözlenmiştir. Fusidik asit içeren jeller, boş kitosan jellere göre IL-6 ekspresyon düzeylerini daha fazla düşürmüş olup boş kitosan jellere etkili olduğu görülmüştür. Fusidik asit içeren ticari krem uygulanan grupta pozitif kontrol grubuna göre IL-6 ekspresyon düzeylerinde anlamli bir azalma gözlenmiştir. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel fusidik asit içeren ticari kreme göre IL-6 düzeylerini daha çok azaltmış olup ticari ürüne karşı daha etkili olduğu görülmüştür.

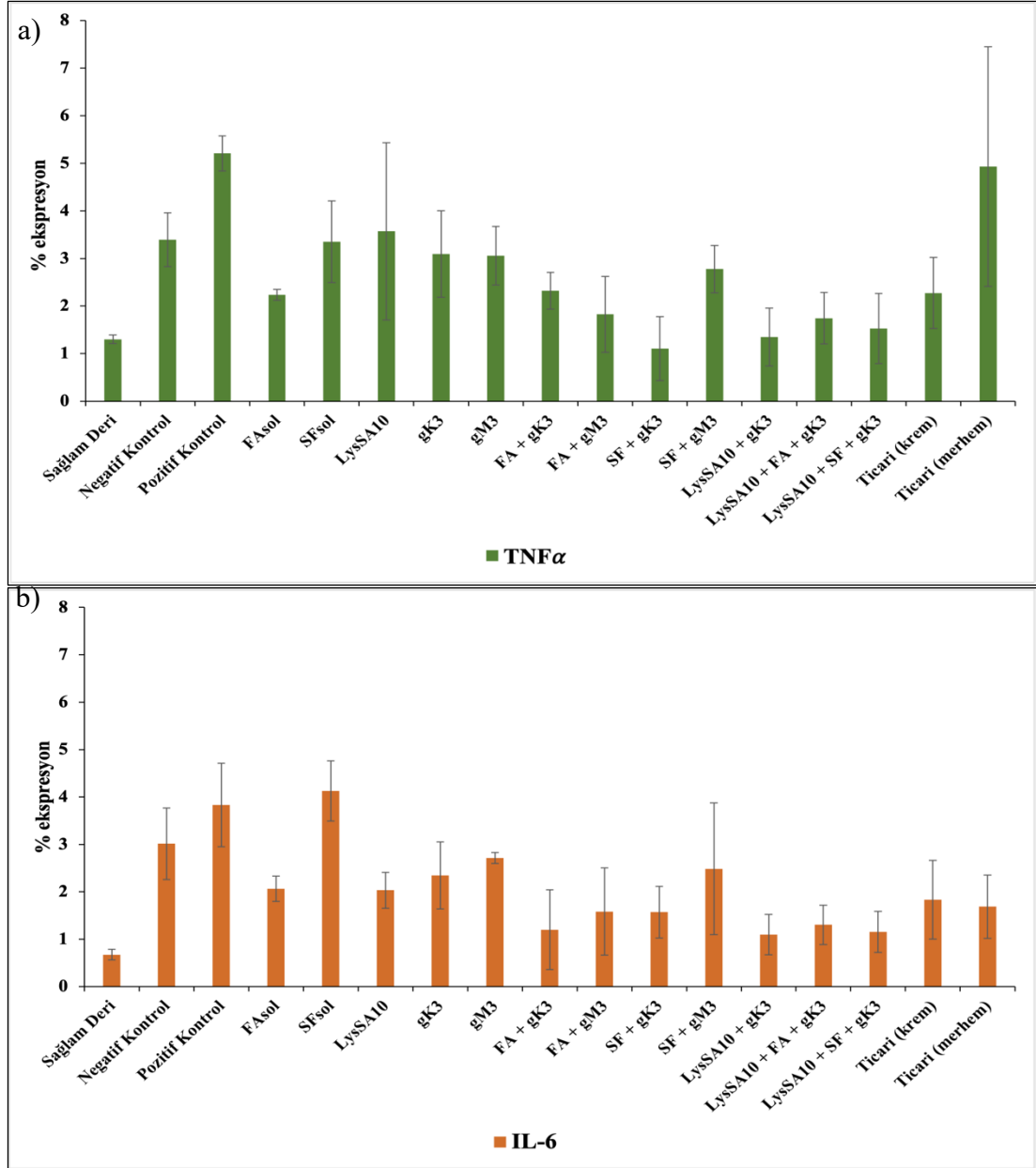
IL-17a düzeyleri

Pozitif kontrol grubunda IL-17a düzeylerinde başlangıç değerine göre anlamli bir artış görülmüştür (Şekil 4.33a.). Fusidik asit çözeltisi (FAsol) uygulanan hayvan grubunda pozitif kontrol grubuna göre IL-17a ekspresyon düzeylerinde anlamli bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuç IL-6 ve TNF- α ekspresyonu ile benzer bulunmuştur. Koyo kitosan jel (gK3) ve orta moleköl ağırlıklı kitosan jel (gM3) uygulanan gruplarda pozitif kontrol grubuna göre IL-17a ekspresyon düzeylerinde anlamli bir azalma gözlenmiştir. Jeller arasında IL-17a ekspresyon düzeylerinde anlamli bir fark yoktur. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3) ve orta moleköl ağırlıklı kitosan jel (FA + gM3) formülasyonları uygulanan gruplarda IL-17a ekspresyon düzeylerinde anlamli bir azalma gözlenmiştir. Fusidik asit içeren jeller, boş kitosan jellere göre IL-17a ekspresyon düzeylerini daha fazla düşürmüş olup boş kitosan jellere etkili olduğu görülmüştür. Fusidik asitin kitosan jel varlığında enfeksiyonda IL-17a ekspresyon düzeyleri üzerinde daha etkili olduğu gösterilmiştir. Fusidik asit içeren ticari krem uygulanan grupta pozitif kontrol grubuna göre IL-17a ekspresyon düzeylerinde anlamli bir azalma gözlenmiştir.

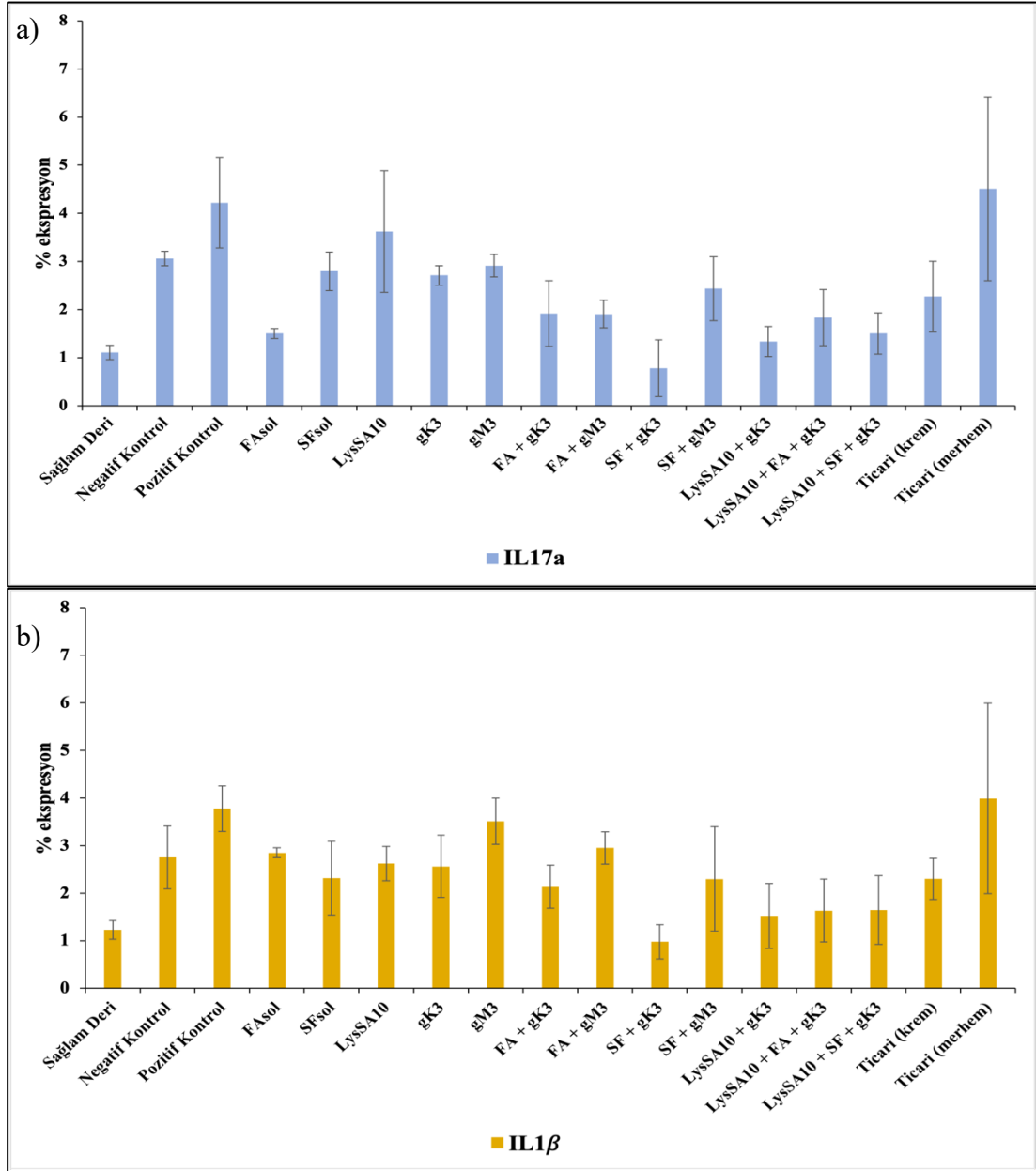
IL1 β düzeyleri

Pozitif kontrol grubunda *IL1 β* düzeylerinde başlangıç değerine göre anlamli bir artış görülmüştür (Şekil 4.33b.). Fusidik asit çözeltisi (FAsol) uygulanan hayvan grubunda pozitif kontrol grubuna göre *IL1 β* ekspresyon düzeylerinde anlamli bir azalma görülmemiştir. Bu sonuç IL-6, IL17a ve TNF- α ekspresyon düzeylerinden farklı bulunmuştur. Koyo kitosan jel (gK3) uygulanan gruplarda pozitif kontrol grubuna göre *IL1 β* ekspresyon düzeylerinde anlamli bir azalma gözlenirken ve orta moleköl ağırlıklı kitosan jel (gM3) uygulanan grupta anlamli bir fark görülmemiştir.

Fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3) formülasyonları uygulanan gruplarda *IL1 β* ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenirken ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel (FA + gM3) uygulanan grupta anlamlı bir fark görülmemiştir. Fusidik asitin koyo kitosan jel varlığında *IL1 β* ekspresyon düzeyleri üzerinde daha etkili olduğu gösterilmiştir. Fusidik asit içeren ticari krem uygulanan grupta pozitif kontrol grubuna göre *IL1 β* ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.32. Deri örneklerindeki sitokin ekspresyonu (enfeksiyon sonrası 11. gün): a)TNF- α ve b)IL-6.



Şekil 4.33. Deri örneklerindeki sitokin ekspresyonu (enfeksiyon sonrası 11. gün): a)IL17a ve b)IL1β.

Sodyum fusidat içeren jel formülasyonları

Lezyon alanı ve iyileşmesi

Diğer etkin maddemiz olan sodyum fusidat tek başına çözelti (SFsol) halinde uygulandığında ise enfeksiyon sonrası 11. gün sonuna kadar iyileşmenin görülmediği ve lezyon alanında artış olduğu gözlemlenmiş olup pozitif kontrole göre anlamlı bir fark görülmemiştir.

Koyo kitosan jel içinde hazırlanan sodyum fusidat formülasyonu (SF+gK3) uygulanan grupta enfeksiyon sonrası 9. günden sonra lezyon alanlarında azalma gözlenerek enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda iyileşme olduğu gözlemlenmiştir. Sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF+gM3) uygulanan gruplarda uygulama sonrasında jel yara lezyonu üzerinde birikmiş olup yara enfeksiyon sonrası 9. günden sonra lezyon alanında azalma gözlenmesine rağmen yaranın enfeksiyon sonrası 11. günün sonuna kadar iyileşmediği görülmüştür.

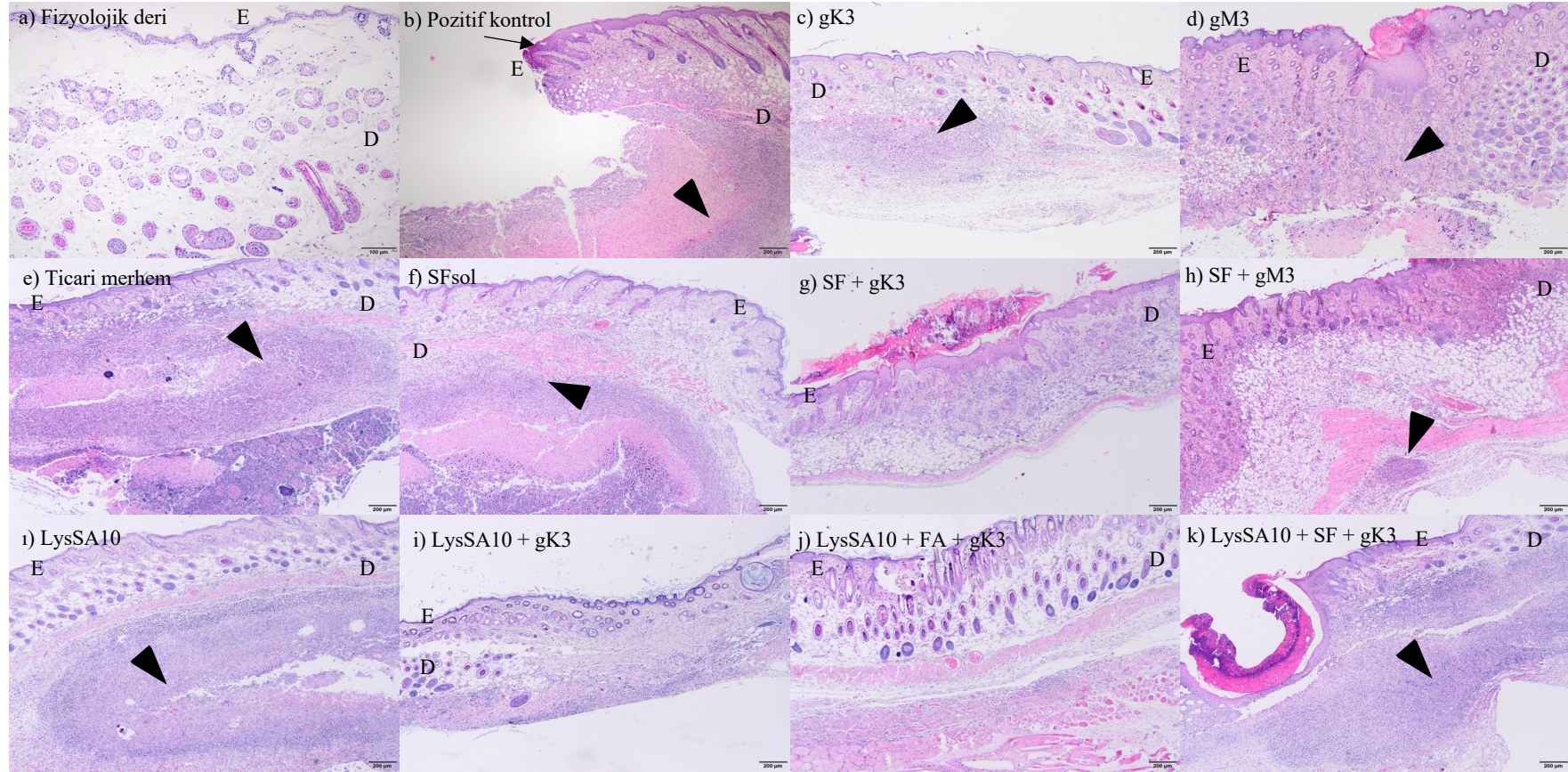
Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta enfeksiyon sonrası 11. günün sonunda lezyonun iyileşmediği ve lezyon alanının da arttığı gözlemlenmiştir.

Histopatolojik inceleme

Kontrol grupları ve formülasyon uygulanan gruplara ait deri örnekleri histopatolojik olarak değerlendirilmiş lezyonlara ait histoloji Şekil 4.34.'te, histopatolojik değerlendirme skorları Tablo 4.19.'da verilmiştir.

Histopatolojik skorlar akut ve kronik enflamasyon yönüyle incelendiğinde (Tablo 4.19.) koyo kitosan jel ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel içinde hazırlanan sodyum fusidat formülasyonları (SF+gK3 ve SF + gM3) ve fusidik asit içeren kitosan jel formülasyonlarına göre yara iyileşmesinde daha etkili olduğu görülmüştür. Buna benzer şekilde sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha etkili bulunmuştur.

Apse alanları incelendiğinde fusidik asit içeren jel formülasyonları uygulanan gruplara göre sodyum fusidat içeren kitosan jel formülasyonlarında apse alanının daha küçük olduğu (Şekil 4.34.).



Şekil 4.34. Enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda lezyonların histopatolojisi. (a) fizyolojik deri, (b) pozitif kontrol, (c) %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel (gK3), (d)%3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jel (gM3), (e) sodyum fusidat içeren ticari merhem, (f). sodyum fusidat çözeltisi (SFsol), (g) sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3), (h) sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3), (i) Endolizin çözeltisi (LysSA10), (i)Endolizin içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + gK3), (j) Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + FA + gK3), (k) Endolizin ve sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + SF + gK3) uygulanan grup ve (p) fizyolojik deri ülserasyon (ok →) ve apse oluşumu (ok ucu ►) E: Epidermis, D:Dermis.

Bakteriyel yük

Sodyum fusidat çözeltisi (SFsol) uygulanan gruplarda bakteriyel yük 5×10^7 CFU/mL pozitif kontrole göre anlamlı bir anlamlı fark yoktur ($p>0,5$). Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) uygulanan grupta bakteriyel yükte anlamlı azalma görülmüş olmakla birlikte orta molekül ağırlıklı kitosan jelde pozitif kontrole göre bir fark gözlenmemiştir ($p>0,5$).

Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda bakteriyel yük pozitif kontrole göre anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). Geliştirdiğimiz sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel ile sodyum fusidat içeren ticari merhem bakteriyel yükte anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p<0,5$).

MPO aktivitesi

Sodyum fusidat çözeltisi uygulanan grupta MPO aktivitesinde pozitif kontrole göre azalma gözlenmiştir. Gerek sodyum fusidat tek başına gerekse jel formülasyonu içinde uygulandığında MPO aktivitesi değerlerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Farklı kitosanlar ile geliştirilen jel formülasyonları arasında ise MPO aktivitesinde fark bulunmamıştır. Sodyum fusidat içeren ticari merheme ait MPO aktivitesi geliştirdiğimiz formülasyonlarla karşılaştırdığımızda aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Sitokin düzeyi

Kontrol grubu ve sodyum fusidat içeren jel formülasyonu uygulanan gruplardan alınan deri örneklerinde tayin edilen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ ve $IL-17a$ düzeyleri Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.'te sunulmuştur.

$TNF-\alpha$ düzeyleri

Sodyum fusidat çözeltisi (SFsol) uygulanan hayvan grubunda pozitif kontrol grubuna göre $TNF\alpha$ ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.32a.). Bununla birlikte koyo kitosan jel (gK3) ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel (gM3) uygulanan gruplarda sodyum fusidat çözeltisi uygulanan gruba göre $TNF\alpha$ ekspresyon düzeylerinde anlamlı fark görülmemiştir. Sodyum fusidat içeren koyo

kitosan jel (SF+gK3) uygulanan grupta TNF α ekspresyon düzeylerinde pozitif kontrol, sodyum fusidat çözeltisi, kitosan jeller ve sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3) uygulanan gruplara göre anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Düşük TNF- α düzeyleri formülasyonun etkili olduğunu göstermektedir. Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta TNF α ekspresyon düzeylerinde pozitif kontrol grubu ile arasında anlamlı bir fark yoktur.

IL-6 düzeyleri

Sodyum fusidat çözeltisi (SFsol) uygulanan hayvan grubunda pozitif kontrol grubuna göre IL-6 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3) formülasyonları uygulanan gruplarda IL-6 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Boş kitosan jeller ile karşılaştırıldığında sodyum fusidat kitosan jeller varlığında IL-6 ekspresyonu düzeyini daha çok azaltmıştır. Sodyum fusidat ticari merhem uygulanan grupta pozitif kontrol grubuna göre IL-6 ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

IL-17a düzeyleri

Sodyum fusidat çözeltisi (SFsol) uygulanan hayvan grubunda pozitif kontrol grubuna göre IL-17a ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.33a.). Bu sonuç TNF- α ekspresyonu ile benzer bulunmuştur. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) formülasyonu uygulanan gruplarda IL-17a ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3) jel ile karşılaştırıldığında sodyum fusidat koyo kitosan jel varlığında IL17a ekspresyonu üzerinde daha etkili olmuştur.

Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta pozitif kontrol grubuna göre IL-17a ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

IL1 β düzeyleri

Sodyum fusidat çözeltisi (SFsol) uygulanan hayvan grubunda pozitif kontrol grubuna göre *IL1 β* ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil 4.33b.). Bu sonuç IL-6 ve IL17a ekspresyon düzeylerine benzer bulunmuştur. Sodyum

fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel (FA + gM3) formülasyonları uygulanan gruplarda *IL1 β* ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) formülasyonunun daha etkili olduğu daha düşük *IL1 β* düzeyleriyle gösterilmiştir. Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta pozitif kontrol grubuna göre *IL1 β* ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sodyum fusidat içeren jel formülasyonları ticari merheme göre daha etkili bulunmuştur.

Endolizin İçeren Jel Formülasyonları

Lezyon alanı ve iyileşmesi

Bir diğer etkin madde endolizin çözeltisi (LysSA10) tek başına uygulandığında takip edilen 11 gün boyunca lezyon alanında artış görülmüş olup tam iyileşme gözlenmemiştir. Bu grupta enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda lezyon alanında pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmemiştir. Koyo kitosan jel içinde hazırlanan endolizin formülasyonu uygulanan grupta lezyonun enfeksiyon sonrası 7. günde kapanmaya başladığı, enfeksiyon sonrası 7. günden sonra lezyon alanlarında azalma görüldüğü ve enfeksiyon sonrası 11. günün sonunda ise tamamen iyileştiği gözlemlenmiştir.

Histopatolojik inceleme

Histopatolojik skorlar akut ve kronik enflamasyon yönüyle incelendiğinde (Tablo 4.19.). Endolizin çözeltisi (LysSA10) uygulanan hayvan gruplarında akut enflamasyon skoru pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma görülmüştür. Skorlar akut ve kronik enflamasyon yönüyle incelendiğinde (Tablo 4.19.) koyo kitosan jel içinde hazırlanan endolizin formülasyonu (LysSA10 + gK3) yara iyileşmesinde geliştirilen diğer jel formülasyonlarına göre daha etkili olduğu görülmüştür. Buna benzer şekilde fusidik asit içeren krem ve sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha etkili bulunmuştur.

Akse alanları incelendiğinde koyo kitosan jel içinde hazırlanan endolizin formülasyonu (LysSA10 + gK3) uygulanan grupta enfeksiyon sonrası 11. günün sonunda akse yok olmuş ve lezyon iyileşmeyi tamamen iyileştirmiştir.

Bakteriyel yük

Endolizin çözeltisi uygulanan hayvanlarda enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda bakteriyel yük 2×10^5 CFU/mL olup, pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,5$). Kitosan jel tek başına ve endolizin içeren koyo kitosan jelin (LysSA10 + gK3) uygulanan gruplarda bakteriyel yükte anlamlı bir azalma görülmüştür. Fusidik asit ve sodyum fusidat içeren kitosan jeller arasında sodyum fusidat içeren koyo kitosan jelin bakteriyel yükü endolizin içeren kitosan jel ile benzer elde edilmiş ve etkililiği gösterilmiştir.

MPO aktivitesi

Gerek endolizin tek başına gerekse jel formülasyonu içinde uygulandığında MPO aktivitesi değerlerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Fusidik asit içeren ticari kreme ait MPO aktivitesine endolizin içeren kitosan jelde daha düşük MPO aktivitesi elde edilmiştir.

Sitokin düzeyi

Kontrol grubu ve endolizin içeren jel formülasyonu uygulanan gruplardan alınan deri örneklerinde tayin edilen $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ ve $IL-17a$ düzeyleri Şekil 4.32 ve Şekil 4.33.'te sunulmuştur.

$TNF\alpha$ düzeyi

Endolizin çözeltisi (LysSA10) uygulanan hayvan gruplarında hayvan grubunda pozitif kontrol grubuna göre $TNF\alpha$ ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.32a.). Endolizin içeren kitosan jel (LysSA10+gK3) uygulanan grupta $TNF\alpha$ ekspresyonunda pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Endolizinin koyo kitosan jel varlığında $TNF\alpha$ ekspresyonunu azaltmış olup enflamasyonda endolizin çözeltisine ve boş kitosan jele göre daha etkili bulunmuştur. Fusidik asit içeren ticari krem ve sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha düşük $TNF\alpha$ ekspresyonu ile enflamasyonda etkinliğinin daha fazla olduğu görülmektedir.

IL-6 düzeyi

Endolizin çözeltisi (LysSA10) uygulanan hayvan grubunda IL-6 ekspresyon düzeyi pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Endolizin içeren koyo kitosan jel (LysSA10+gK3) uygulanan grupta endolizin çözeltisi uygulanan gruba arasında anlamlı bir azalma vardır. Endolizinin koyo kitosan jel varlığında IL-6 ekspresyonunu azaltmış olup enflamasyonda endolizin çözeltisine ve boş kitosan jele göre daha etkili bulunmuştur. Fusidik asit içeren ticari krem ve sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha az IL-6 ekspresyonu ile enflamasyonda daha etkili bulunmuştur.

IL-17a düzeyi

Endolizin çözeltisi (LysSA10) uygulanan hayvan gruplarında IL17a ekspresyon düzeyi pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Endolizin içeren koyo kitosan jel (LysSA10+gK3) uygulanan grupta IL17a ekspresyon düzeyi endolizin çözeltisine göre da az elde edilmiştir. Endolizinin koyo kitosan jel varlığında IL-17a ekspresyonunu azaltmış olup enflamasyonda endolizin çözeltisine ve boş kitosan jele göre daha etkilidir. Fusidik asit içeren ticari krem ve sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha az IL-17a ekspresyonu ile enflamasyonda daha etkili bulunmuştur.

IL1 β düzeyi

Endolizin çözeltisi (LysSA10) uygulanan hayvan gruplarında IL1 β ekspresyon düzeyi pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Endolizin içeren koyo kitosan jel (LysSA10+gK3) uygulanan grupta IL1 β ekspresyon düzeyi endolizin çözeltisi uygulanan gruba göre daha az elde edilmiştir. Endolizinin koyo kitosan jel varlığında IL1 β ekspresyonunu azaltmış olup enflamasyonda endolizin çözeltisine ve boş kitosan jele göre daha etkili bulunmuştur. Fusidik asit içeren ticari krem ve sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha az IL1 β ekspresyonu ile enflamasyonda daha etkilidir.

Endolizin+Fusidik Asit Kombinasyonu İçeren Jel Formülasyonları

Lezyon alanı ve iyileşmesi

Koyo kitosan jel içinde hazırlanan Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu (LysSA10 + FA + gK3) uygulanan grupta yara enfeksiyon sonrası 6. günden sonra lezyon alanında azalma gözlenerek enfeksiyon sonrası 7. gün sonunda kapanmaya başlamış olup enfeksiyon sonrası 11. günün sonunda tam iyileşme görülmüştür. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3) uygulanan grupta iyileşme enfeksiyon sonrası 9. günde başlamış olup endolizinin varlığında iyileşme süreci hızlanmıştır.

Histopatolojik inceleme

Histopatolojik skorlar akut ve kronik enflamasyon yönüyle incelendiğinde (Tablo 4.19.) koyo kitosan jel içerisinde hazırlanan endolizin ve fusidik asit kombinasyonu uygulanan hayvan gruplarında yara iyileşmesinde geliştirilen diğer jel formülasyonlarına göre daha etkili olduğu görülmüştür. Buna benzer şekilde fusidik asit içeren krem ve sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha etkili bulunmuştur.

Apse alanları incelendiğinde endolizin ve fusidik asit kombinasyonu uygulanan hayvan grupların apse alanında azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.34.).

Bakteriyel yük

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonunu içeren koyo kitosan jel formülasyonu uygulanan grupta ait bakteriyel yük $9,6 \times 10^5$ CFU/mL elde edilmiş olup bakteriyel yükte pozitif kontrole göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Geliştirmiş olduğumuz formülasyonlarla fusidik asit içeren krem arasında bakteriyel yükte fark bulunmamış ($p>0,05$) olup sodyum fusidat içeren ticari merhem göre daha düşük bakteriyel yük elde edilmiştir ($p<0,5$).

MPO aktivitesi

Koyo kitosan jel içinde endolizin ve fusidik asit kombinasyonu uygulanan grupta MPO aktivitesinde pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel, fusidik asit içeren ticari kreme göre düşük MPO aktivitesiyle daha etkili bulunmuştur.

Sitokin düzeyi

TNF α düzeyi

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan gruplarında %1,74 \pm 0,5 oranında TNF α ekspresyonu gözlenmiş olup pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyonda anlamlı bir fark vardır. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel ile karşılaştırıldığında endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel daha az TNF α ekspresyonu ile daha etkili olduğu gösterilmiştir.

IL-6 düzeyleri

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan gruplarında %1,3 \pm 0,4 oranında IL-6 ekspresyonu gözlenmiş olup pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyonda anlamlı bir fark vardır. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel ile karşılaştırıldığında endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel benzer IL-6 ekspresyonu ile benzer etkileri olduğu gözlenmiştir.

IL-17a düzeyi

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan gruplarında %1,83 \pm 0,6 oranında IL-17a ekspresyonu gözlenmiş olup pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyonda anlamlı bir fark vardır. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel ile karşılaştırıldığında endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel benzer IL-17a ekspresyonu ile benzer etkileri olduğu gözlenmiştir.

IL1 β düzeyi

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan gruplarında %1,63 \pm 0,7 oranında IL1 β ekspresyonu gözlenmiş olup pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyonda anlamlı bir fark vardır. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel ile karşılaştırıldığında endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel daha az IL1 β ekspresyonu ile daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Endolizin+Sodyum Fusidat Kombinasyonu İçeren Jel Formülasyonları

Lezyon alanı ve iyileşmesi

Koyo kitosan jel içinde hazırlanan endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu formülasyonu (LysSA10 + SF + gK3) uygulanan grupta enfeksiyon sonrası 7. günden sonra lezyon alanlarında azalma gözlenmiş, yara enfeksiyon sonrası 7. günün sonunda kapanmaya başlamış olup enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda tam iyileşme görülmüştür. Boş koyo kitosan jel tek başına uygulandığında enfeksiyon sonrası 11. günün sonunda yara lezyonun iyileştiği gözlemlenmiş olup endolizin ve sodyum fusidatın koyo kitosan jel içinde uygulanmasıyla lezyon alanının iyileşmesi hızlanmıştır. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) uygulanan grupta iyileşme enfeksiyon sonrası 7. günde başlamış olup enfeksiyon sonrası 11. günün sonunda tam iyileşme gözlenmiştir. Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren kitosan jel (LysSA10 + SF + gK3) ile sodyum fusidat içeren koyo kitosan jelin (SF + gK3) ve endolizin içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + gK3) lezyon alanı üzerinde benzer etkileri olduğu görülmüştür.

Histopatolojik inceleme

Skorlar akut ve kronik enflamasyon yönüyle incelendiğinde (Tablo 4.19.) koyo kitosan jel içinde hazırlanan endolizin + sodyum fusidat formülasyonu (LysSA10 + SF + gK3) yara iyileşmesinde geliştirilen sodyum fusidat içeren jel formülasyonlarıyla benzer etki göstermiştir. Apse alanı üzerinde sodyum fusidat içeren jellerle benzer apse alanı göstererek benzer etki gözlemlenmiştir.

Bakteriyel yük

Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonunu içeren koyo kitosan jel uygulanan hayvanlarda bakteriyel yük $1,5 \times 10^4$ CFU/mL olup sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel uygulanan gruba göre anlamlı bir artış görülmüştür. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jelin bakteriyel yük üzerinde daha etkili olduğu gösterilmiştir.

MPO aktivitesi

Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren koyo kitosan jel formülasyonu uygulanan grupta MPO aktivitesinde pozitif kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Boş koyo kitosan jelin MPO aktivitesi ile karşılaştırıldığında aktivitede anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bu durumda endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu kitosan jel varlığında MPO aktivitesini azaltmıştır.

Sitokin düzeyi

TNF α düzeyi

Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan grubunda TNF α ekspresyon düzeyi pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel ile endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jel uygulanan gruplarda TNF α ekspresyon düzeyinde anlamlı bir fark yoktur.

TNF α ekspresyonunun düşük olması yara iyileşmesi göstermektedir. Yara iyileşmesinin sitokin düzeyinde en iyi olan gruplar sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) ve endolizin içeren baz kitosan jel (LysSA10 + gK3) uygulanan gruplardır. Sodyum fusidat + endolizin kombinasyonu sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) etkisini değiştirmemiştir.

IL-6 düzeyi

Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan gruplarında IL-6 ekspresyon düzeyi pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel ile endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jel arasında IL-6 ekspresyon düzeyinde anlamlı bir fark yoktur. Sodyum fusidat + endolizin kombinasyonu sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) etkisini değiştirmemiştir.

IL-17a düzeyi

Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan gruplarında IL-17a ekspresyon düzeyi pozitif kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel, endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jele göre enflamasyonda daha etkili bulunmuştur.

IL-1 β , IL-17a üretimini indüklediği için IL-17a düzeyinin düşük olması enfeksiyonun azaldığını göstermekte olup sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) uygulamasıyla en düşük IL-17a ekspresyon düzeyi elde edilmiştir.

IL1 β düzeyi

Endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan gruplarında IL1 β ekspresyon düzeyi pozitif kontrol grubu göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel, endolizin ve sodyum fusidat kombinasyonu içeren jele göre daha etkili bulunmuştur.

Enfeksiyon varlığında IL1 β ekspresyon düzeyinde artış görülmektedir. IL1 β ekspresyon düzeyinin düşük olması enfeksiyonun azaldığını göstermekte olup sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) uygulanan hayvanlarda en düşük IL1 β ekspresyon düzeyi elde edilmiştir.

4.5.3. Formülasyonlara Ait İn Vivo Sonuçların Karşılaştırılması

Formülasyon uygulamasını takiben enfeksiyon sonrası 6. gün ve enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda elde edilen lezyon alanı, bakteriyel yük, mpo aktivitesi, akut enflamasyon, kronik enflamasyon ve apse alanına ait tüm sonuçlar Tablo 4.20.'de özetlenmiştir. In vivo çalışmalar sonucunda fusidik asit ve sodyum fusidat içeren jeller incelendiğinde, geliştirdiğiniz formülasyonların, her bir incelenen parametre için elde edilen sonuçlar kullanılan kitosan tipine (gM3 ve gK3) bağlı olarak bazı farklılıklar göstermesine karşın, uygulama yapılmayan gruba göre yara iyileşmesini hızlandırdığı görülmüştür. Kullanılan kitosanlar karşılaştırıldığında, yara iyileşmesi üzerinde birbirine anlamlı üstünlükleri olmadığı ancak elde edilen sonuçların Koyo kitosan jel (gK3) içinde hazırlanan formülasyonda biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. Her iki

madde için geliştirdiğimiz formülasyonlar ticari ürünlerle karşılaştırıldığında ise, geliştirdiğimiz formülasyonun yara iyileştirmesinde daha etkili olduğu görölmüştür.

Fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3) ile sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) karşılaştırıldığında sodyum fusidat içeren jelin yara iyileşmesi üzerine daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Endolizin tek başına etkili bulunmamasına karşın, kitosan jel içinde formülasyonu (LysSA10 + gK3) yapıldığında yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Endolizin içeren jel formülasyonu Fusidik asit içeren koyo kitosan jel ve orta molekül ağırlıklı kitosan jele göre daha etkili bulunmuştur. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jele göre benzer etkiye sahiptir. Endolizin + fusidik asit içeren kitosan jel (LysSA10 + FA + gK3) ve endolizin + sodyum fusidat içeren koyo kitosan jellerin (LysSA10+SF+gK3) sitokin düzeyleri ve histopatolojik sonuçlar incelendiğinde yara iyileşmesi üzerinde etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.20. Formülasyon uygulanan ve kontrol grubuna ait değerlendirme (enfeksiyon sonrası 11. günün sonunda).

	Lezyon alanı (cm ²)	Bakteriyel yük (CFU/mL)	MPO (µmol/dk)	Histopatolojik Değerlendirme			Sitokin Düzeyi			
				Akut enf. skoru	Kronik enf. skoru	Apse alanı (mm ²)	TNFα	IL-6	IL17a	IL1β
Negatif kontrol	0,35	1,5 x 10 ⁷	27,02	2	2,6	2,58	Artış	Artış	Artış	Artış
Pozitif kontrol	0,52	1,7 x 10 ⁶	13,94	3	2,57	8,00	Artış	Artış	Artış	Artış
FAzol*	0,32	9 x 10 ³	1,94	1,4	1,2	4,90	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
SFsol	0,28	5 x 10 ⁷	6,25	2,8	2,8	3,9	Azalma	Değişmemiş	Azalma	Azalma
LysSA10	0,2	2 x 10 ⁵	6,37	1,4	2,4	2,2	Değişmemiş	Azalma	Değişmemiş	Azalma
gK3	0,26	1,5 x 10 ⁵	8,63	0,5	1,44	0,66	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
gM3	0,3	2,3 x 10 ⁴	2,64	1,8	1,83	3,66	Azalma	Azalma	Azalma	Değişmemiş
FA+gK3	0,28	1,4 x 10 ⁴	1,9	1,1	1,4	1,9	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
FA+gM3	0,32	7,1 x 10 ⁴	1,91	2	2,3	2,15	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
SF + gK3	0,11	1,1 x 10 ²	3,79	0,8	1,33	0,86	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
SF + gM3	0,13	5,6 x 10 ⁶	5,23	1	1,8	1	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
LysSA10 + gK3	0,07	5,3 x 10 ¹	4,74	0	1,6	0	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
LysSA10 + FA + gK3	0,16	9,6 x 10 ⁵	4,45	0,8	1,4	0,75	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
LysSA10 + SF + gK3	0,04	1,5 x 10 ⁴	4,65	1	1	0,5	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
Fusidik asit içeren ticari krem	0,23	5,4 x 10 ⁵	11,68	1,4	2	2,70	Azalma	Azalma	Azalma	Azalma
Sodyum fusidat içeren ticari merhem	0,14	4,4 x 10 ⁷	4,98	2,2	2	3,85	Değişmemiş	Azalma	Değişmemiş	Değişmemiş

* enfeksiyon sonrası 6. günde sakrifiye edilmiştir.

5. TARTIŞMA

MRSA kaynaklı deri enfeksiyonları hem veteriner hem de beşeri alanda görülmekte olup ileri aşamalarında hayatı tehdit edici boyutlara ulaşabilmektedir. Bu nedenle erken aşamada tedavi, enfeksiyonun ilerlemesi ve yayılmasını engellemektedir. MRSA kaynaklı deri enfeksiyonlarının tedavisinde topikal olarak antibakteriyel maddeler kullanılmaktadır. Topikal yoldan uygulama ile enfekte bölgeye doğrudan yüksek ve sürekli ilaç uygulaması, düşük miktarda antibiyotik gereksinimi, daha iyi uyum, sistemik yan etkilerin azalması ve potansiyel olarak daha az AMR ihtimali gibi sistemik tedaviye göre birçok potansiyel üstünlüğe sahiptir. Tüm dünyada büyük bir tehdit haline gelen antimikrobiyal dirence karşı geliştirilen alternatifler arasında antibiyotikler dışında antibakteriyel aktiviteye sahip başka ilaçlar (faj endolizini gibi) bulunmaktadır. Direnç gelişen antibiyotiklerin etkisini artırmak için çeşitli formülasyon stratejileri geliştirilmiştir. Özellikle, kombine antibiyotik stratejisi ile farklı etki mekanizmalarına sahip ilaçların bir arada kullanılmasıyla direnç gelişimi önlenabilir. Ayrıca, antibiyotiklerin nanoteknoloji bazlı taşıyıcı sistemler ile hazırlanması ilaçların hedef hücrelere daha etkin bir şekilde ulaşması sağlar. Nanoteknoloji bazlı antibiyotik taşıyıcı sistemler, ilaç bozunmasını sınırlandırarak, enfeksiyon bölgesinde ilaç birikimini artırarak ve toksisiteyi azaltarak terapötik etkinliği iyileştirmek için giderek daha uygulanabilir hale gelmektedir. Bunun yanı sıra, ilaçların biyoyararlanımını artıran yeni formülasyonlar, ilacın vücutta daha uzun süre kalmasını sağlayarak etkisini güçlendirebilir. Direnç mekanizmalarını hedef alan ek ajanlar kullanmak ise, hücrelerin direncini azaltarak tedavi etkinliğini artırabilir. Bu stratejilerin bir arada uygulanması, direnç geliştiren patojenlerle mücadelede daha başarılı sonuçlar elde edilmesine yardımcı olabilir.

Tezimizde seçtiğimiz etkin maddelerden bir olan fusidik asit, hem beşeri hem de veteriner alanda metisiline dirençli veya metisiline duyarlı suşlar da dahil olmak üzere stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde genellikle topikal olarak tek başına veya diğer antimikrobiyal ilaçlarla kombine edilerek kullanılan steroid benzeri bir antibiyotiktir (190, 192, 282). Fusidik asit, 5,7 pKa değerine sahip zayıf bir asittir ve pH ~7,4'te plazmada ve dokuda olarak iyonize olmaktadır (283). Bakteriyostatik bir aktiviteye sahip olup çeşitli enfeksiyonların tedavisinde oral, topikal ve parenteral

yolla uygulanmaktadır (190, 283-286). Tez çalışmaları için seçtiğimiz diğer etkin madde olan sodyum fusidat ise fusidik asitin suda çözünen sodyum tuzudur (191).

Tezimizde AMR'ye karşı antibiyotiğe alternatif olarak kullanılabilen bir etkin maddenin formülasyonunu geliştirmeyi de planlamış olup, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından geliştirilen endolizin (LysSA10) kullanılmasına karar verilmiştir. Faj endolizini, peptidoglikan içindeki sadece korunan bağları hedef almalarından dolayı direnç geliştirme olasılığının düşük olması nedeniyle geleneksel antibiyotiklere göre bir avantaja sahiptir. Endolizinlerin konvansiyonel geniş spektrumlu antibiyotiklere göre en büyük üstünlüğü, spesifik bakterisidal aktivite göstermeleri ve faydalı mikrobiyotayı öldürmemeleridir (214).

Bu kapsamda, deride MRSA kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde topikal yolla uygulanacak antibiyotik direncine karşı halihazırda kullanılan bir etkin madde için etkililiği artırılmış ya da antibiyotiğe alternatif olarak kullanılabilen bir etkin madde için yeni bir formülasyon geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, seçilen bu etkin maddelerin ayrı ayrı etkinlikleri ve stabiliteelerini artırmak amacıyla jel formunda formülasyonlar geliştirilmiştir. Jel formülasyonları biyogeçimli, biyoadeziv özelliklere sahip katyonik bir biyopolimer olan kitosan kullanılarak hazırlanmıştır. Kitosan, hem istenilen formda bir taşıyıcı sistemin tasarımına olanak vermesi, hem de kendisinin penetrasyon artırıcı, yara iyileştirici, antiinflamatuvar, antimikrobiyal aktiviteler sahip olması nedeniyle seçilmiştir. Ayrıca, katyonik yapısı ve biyoadeziv özelliği nedeniyle formülasyonun uygulama bölgesinde daha uzun süre kalmasını ve ilacın derinin içine daha iyi penetrasyonu mümkün kılmaktadır. Bu sayede, tedavide etkinliği artırılmış, enfeksiyon lezyonlarının iyileşmesini hızlandıran ve yan etkileri en aza indirilmiş kolay hazırlanabilen, kolay uygulanabilen, uygulama bölgesinde hemen uzaklaşmayacak, stabilitesi yüksek bir topikal ilaç formülasyonu tez kapsamında gerçekleştirilmek hedeflenmiştir. Buna ek olarak, geliştirilen formülasyonun, enfeksiyonun sistemik dolaşıma geçmeden lokal olarak kontrol edilmesini sağlamak diğer bir hedefimiz olmuştur.

Bu amaç doğrultusunda öncelikle farklı özellikler sahip kitosanolardan hareketle jel formülasyonları hazırlanmıştır. Formülasyonların karakterizasyonu gerçekleştirildikten sonra ilk olarak in vitro çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Öncelikle,

formülasyonların hücre canlılığı üzerinde etkisi (biyogeçimliliği) incelenmiştir. Daha sonra, uygulama bölgesinde istenen süre boyunca etkili konsantrasyonda etkin madde salımının sağlandığını göstermek amacıyla *in vitro* adezyon ve salım çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen formülasyonların etkinliğini göstermek için öncelikle *in vitro* olarak antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Sonrasında geliştirilen formülasyonların etkinliği *in vivo* olarak subkütan enfeksiyon modeli ile MRSA enfeksiyonu oluşturulmuş hayvan modelinde gösterilmiştir. Bu amaçla, antibakteriyel aktiviteyi görmek için bakteriyel yük tayini, enflamasyonu değerlendirmek incelenmesi MPO tayini ve histopatolojik analizler gerçekleştirilmiştir. İmmün yanıt etkisinin incelenmesi içinse farklı sitokinlerin tayini yapılmıştır.

5. 1. Jel Formülasyonlarının Geliştirilmesi

Çalışmalarımızda antibakteriyel aktivitelerini arttırmayı ve AMR ile mücadele için bir çözüm olarak şekilde fusidik asit, sodyum fusidat, endolizin, ve bu etkin maddelerin kombinasyonunu içeren jel formülasyonları hazırlanmıştır. Jellerin hazırlanmasında kendisinin de antibakteriyel aktivite, yara iyileştirici etkisi olduğu bilinen gösteren ve katyonik, biyoadeziv ve penetrasyon artırıcı özellik sahip bir polimer olan kitosan kullanılmıştır. Kitosanın özelliklerinin antimikrobiyel aktivite üzerine etkisini değerlendirmek için farklı molekül ağırlığı ve farklı çözünürlüğe (suda veya dilüe asitte) sahip kitosanlar seçilmiş olup, bu kitosanların farklı konsantrasyonlarında jeller hazırlanmıştır. Geliştirdiğimiz formülasyonlarla ilacın uygulama bölgesinden hemen uzaklaşmasını engelleyerek, daha uzun süreli salımı ve deri içine daha iyi penetrasyonunun sağlanması hedeflenmiştir.

Fusidik asit ve sodyum fusidat için beyaz renkte opak jeller elde edilmiştir. Endolizin ve kombinasyonu için ise hafif sarı renkte opak görünümde jeller elde edilmiştir. Genel olarak fusidik asit ve sodyum fusidat içeren formülasyonların pH'sı 4-5 civarında bulunmuştur (Tablo 4.9.). Endolizin tek başına ve kombinasyon olarak içeren formülasyonların pH'sı ise 5.5 civarında olmuştur. Sağlıklı bir derinin pH'sı 4.0 ve 7.0 arasındadır (287). Enfeksiyon varlığında ise deri pH'sında artış gözlenmekte olup topikal formülasyonlarla artmış deri pH'sını asitleştirmek amaçlanmakta ve böylelikle asidik pH deriye antimikrobiyal bir bariyer oluşturması beklenmektedir (288). Mikroorganizmaların oluşumu ve dağılımında pH rol oynamaktadır (289).

Asidik deri pH'sı, cilt bariyeri homeostazının ve geçirgenliğinin korunması için merkezi bir düzenleyici faktör olarak kabul edilmektedir (290). Bu nedenle formülasyonun pH'sının antibakteriyel aktivitesi üzerinde önemli bir rolü bulunmaktadır. Kitosan jelin pH'sı asitleştikçe antibakteriyel aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir (291), bizim formülasyonlarımızla da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, geliştirilen formülasyonlarının pH'sı da deride iritasyon yapmayacak şekilde güvenli olmasını sağlamaktadır.

Çalışmalarda kullandığımız etkin maddelerden fusidik asitin suda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle jeller içinde homojen dispersiyonunu sağlayabilmek amacıyla formülasyonlara gerçekleştirilebilmek için sürfaktan eklenmesine karar verilmiştir. kullanılmıştır. Bu amaçla farklı özellikte sürfaktanlar Span 20, Span 80 (lipofilik özellikte) ve Tween 20 ve Tween 80 (hidrofilik özellikte) farklı konsantrasyonlarda incelenmiştir. Non-iyonik bir sürfaktan olan Tween 80, %3 (a/h) konsantrasyonda fusidik asitin suda çözünürlüğünü arttırdığı ve kitosan jelde homojen bir şekilde dağıldığı bulunmuştur. Formülasyonlara bu şekilde devam edilmiştir.

Öte yandan fusidik asidin suda çözünür tuzu olan sodyum fusidat ile jeller hazırlanmış ve antibakteriyel aktiviteleri bu doğrultuda karşılaştırılmıştır.

Çalışmalarımızda kullandığımız kitosan katyonik bir polimer olup, zeta potansiyeli pozitifdir. Zeta potansiyelin kitosanın konsantrasyonuna bağlı olarak değişmediği, kitosanın molekül ağırlığının artmasına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Formülasyonlarımızda kitosan jellere etkin maddeler eklendiğinde zeta potansiyelde hafif değişiklikler olsa da formülasyonların yükü pozitif kalmıştır (Tablo 4.9.). Fusidik asit ilavesiyle zeta potansiyelde artış gözlenirken, sodyum fusidatın ilavesiyle zeta potansiyelde düşüş görülmüştür. Zeta potansiyel çözeltinin iyonik kuvveti ile orantılıdır (292). Suda çözünen sodyum fusidatta yer alan Na⁺ iyonu partiküllerin elektrik yüklerini azaltarak zeta potansiyelde düşüşe neden olmuştur. Jelin pozitif yüklü olmasının deriye uygulanan bir ürün ve yara iyileşmesi için önemini tartışman gerekiyor. Jellere endolizin ve kombinasyonları eklendiğinde de benzer sonuçlar alınmıştır.

Faj türevi enzimlerin uygulanması, enjeksiyon yolu ile (intravenöz ve intraperitoneal), topikal uygulamalar (kremler, merhemler ve jeller), transnazal,

vajinal ve oral uygulama sistemleri dahil olmak üzere farklı yollarla uygulanabilmektedir (293). Faj endolizininin oral yol ile uygulanması gastrointestinal sistemde salgılanan proteolitik enzimler ve asidik pH nedeniyle enzimatik aktiviteyi koruma zorluğuna sahiptir. Faj endolizininin enkapsülasyonu ile sorunu çözmek için koruyucu bir strateji sağlayabileceği düşünülmektedir (205).

Portilla ve ark. (217), yaptığı bir çalışmada pH'a duyarlı lipozomlarda LysRODI endolizinin enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Lipozomların hafif asidik koşullar altında endolizinin hedefe iletilmesini sağlama yeteneğini göstermektedir. pH'a duyarlı lipozomlarda LysRODI endolizinin enkapsülasyonu ile lipozomların hafif asidik koşullar altında endolizinin hedeflendirilmiş iletimi sağlanmıştır. Enkapsüle edilmiş LysRODI endolizini, pH 5'te *S. aureus*'un hücre sayısını önemli ölçüde azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir. Hathaway ve ark. (219), LysK endolizin ve lizostafinin termal olarak tetiklenen Poli (N-izopropilakrilamid) (PNIPAM) nanopartiküllerindeki kesilmiş sistein histidin bağımlı amino hidrolaz/peptidaz (CHAPK) alanını, enfeksiyonun standart bir göstergesi olan daha yüksek bir sıcaklıkta CHAPK iletimi için geliştirmiştir. PNIPAM, düşük kritik çözelti sıcaklığında (LCST) geri dönüşümlü olarak faz geçişine uğrayabilen ve bunun sonucunda su atılımına ve ardından polimer hacminde bir değişime yol açan termostatik bir polimerdir. Hazırlanan formülasyon ile belirli bir bakteriyel enfeksiyonla ilişkili olabilecek belirli bir sıcaklıkta endolizinin taşınımı için tasarlanmıştır. Topikal ürünlerin performansı büyük ölçüde viskozitelere bağlıdır. Hazırlanan jellerin viskozitesinin uygulama için uygun kıvamda olduğu görülmüştür (134-5989 cP) (Tablo 4.9.). Düşük kitosan konsantrasyonunda hazırlanan formülasyonlarda Newtonian akış gözlenmiştir. Akış özelliklerinin kitosanın molekül ağırlığı ile de değiştiği görülmüştür. Genel olarak konsantrasyon artışı ile pseudoplastik akışı geçiş olduğu görülmüştür. Etkin madde ilavesiyle viskozitede azalma görülmüştür. Karşılaştırma için incelenen fusidik asit içeren ticari krem ve sodyum fusidat içeren ticari merhemde de pseudoplastik akışa sahip olduğu görülmüştür. Kitosan jellerle yapılan çalışmalarda genellikle formülasyonların pseudoplastik akış gösterdiği bildirilmiştir (111 -115). Pseudoplastik akış, kuvvet uygulandığında viskozitenin azaldığını göstermekte olup, formülasyonun deriye uygulanması sırasında sistemin kıvamı azalarak, uygulama kolaylığı sağlanabilecektir. Viskozite formülasyon için deriye uygulama kolaylığı ve

yayılabilirliği açısından önemlidir. Öte yandan uygulama bölgesinde ilacın kalış süresini uzatmak için formülasyonun adezyon özellikleri de önemlidir (294). Yara dokusu formülasyonun uygulama yerinde adezyonunu zorlaştırmaktadır. Adezyon sayesinde uygulanan ilaç formülasyonu daha uzun süre deri üzerinde kalarak, etkili bir lokal ilaç konsantrasyonu ve sonucunda artırılmış etki sağlayacaktır. Kitosanın biyoadeziv özelliğiyle formülasyonlarımızın etkinliğini daha da artırmak hedeflenmiştir. Geliştirilen formülasyonların, özellikle fusidik asit ve sodyum fusidat içerenlerde, adezyon özellikleri incelendiğinde istediğimiz sürece uygulama bölgesinde kalacak şekilde bir adezyonun sağlandığı gösterilmiştir (Tablo 4.9.). Kitosanın molekül ağırlığının ve konsantrasyonunun artışına bağlı olarak adezyonun arttığı görülmüştür. Endolizin ve kombinasyonları içeren formülasyonlarda ise adezyon daha düşük bulunmakla birlikte uygulama için uygunluğunun sürdürdüğü görülmüştür. Jellerin viskozitesi ve adezyon özellikleri birlikte incelendiğinde, artan viskoziteye bağlı olarak adezyonun arttığı gözlenmiştir. Jellerin mekanik özelliklerini değiştiren bir diğer etken ise jellerin viskozitesidir (295).

Piyasa preparatlarına ait adezyon sonuçları incelendiğinde ise sodyum fusidat içeren ticari merhemde adezyon özelliği, fusidik asit içeren ticari kreme göre daha yüksek bulunmuştur. Daha yüksek viskoziteye sahip sodyum fusidat içeren ticari merhemde daha yüksek adezyona sahip olduğu gözlenmiştir. Sodyum fusidat içeren ticari merhem yapısında susuz lanolin bulundurması nedeniyle yağ bazlı bir formülasyona sahiptir. Bu nedenle sodyum fusidat içeren merhemde viskozite ve adezyon özelliklerinin yüksek olması yapısının yağ bazlı oluşuyla açıklanabilir.

Bulduğu kaptan ürünün kolay çıkarak uygulanabilmesi önemlidir. Geliştirdiğimiz formülasyonların bu özelliğini görebilmek için şırınga edilebilirlik özellikleri incelenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız kitosanın molekül ağırlığının artışına bağlı olarak viskozitesinin ve dolayısıyla şırınga edilebilirlik işinin de arttığı ve formülasyonun tüpten çıkarılması için uygulanan kuvvetin arttığı görülmüştür. Genellikle şırınga edilebilirlik değeri 50 N.mm altında olması beklenmektedir. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde, elde edilen değerlerin (27,45 N.mm) geliştirdiğimiz formülasyonların rahatlıkla kaptan çıkabileceğini göstermiştir (Tablo 4.16. ve Tablo 4.17.). Viskozite, adezyon ve şırınga edilebilirlik gibi formülasyon

özellikleri formülasyonda kullanılan biyoadhesif polimerin özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (296, 297).

5. 2. Formülasyonların İn Vitro Değerlendirilmesi

5.2.1. İlaç Salımı

Yara enfeksiyonlarının tedavisinin etkili olması için etkin maddeyi istenen miktarda istenen süre boyunca salımını sağlayacak formülasyonların geliştirilmesi önemlidir. Bu amaçla ilacın formülasyondan salınan miktarı ve hız önemlidir. Bu amaçla geliştirdiğimiz formülasyonlardan ilaç salımı incelenmiştir. İlaç salımının jel formülasyonunda taşıyıcı olarak kitosanın özelliklerine (molekül ağırlığı, çözünürlüğü) ve konsantrasyonuna göre değiştiği görülmüştür (Tablo 4.11.). Ayrıca etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak da salım özelliklerinde farklılıklar görülmüştür. Sodyum fusidatın suda çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle yüzde salınan etkin madde miktarı, suda çözünürlüğü düşük olan fusidik asite göre daha yüksek bulunmuştur. 6 saat sonunda en yüksek salım % 46,36 olup, %3'lük koyo kitosan jel içinde hazırlanan sodyum fusidat formülasyonu (SF + gK3) ile elde edilmiştir. Kitosanın molekül ağırlığındaki artışına bağlı olarak ilaç salımının azaldığı görülmüştür (Tablo 4.11.). Polimerin molekül ağırlığına ilaveten ve konsantrasyondaki artış da hazırlanan jelin viskozitesinin artması neden olduğu için etkin maddelerimizin salımında azalma görülmüştür. Fusidik asit ve sodyum fusidat içeren farklı polimerlerle yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilmiştir (298). Yüksek viskoziteye sahip jellerde, polimer zincirleri daha yoğun bir ağ oluşturmaktadır ve bu yapı içinde etkin maddelerin difüzyonu zorlaşarak salım miktarı azaltmaktadır (299, 300).

Geliştirdiğimiz formülasyonlardan ilaç salım miktarlarının %50'nin altında olmasına karşın, membranda kalan miktarlar göz önünde bulundurulduğunda, etkin maddelerin uygulama bölgesinde birikerek daha uzun süre yavaş yavaş salım sağlayacağını göstermektedir. görülmektedir. Bu profil ise uygulama bölgesinde daha etkili lokal bir tedavi sağlayacağını göstermektedir (301, 302).

5.2.2. Antibakteriyel Aktivite

Çalışmamızda jel formülasyonu için taşıyıcı olarak geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahip olan kitosan seçilmiştir (159, 303-306). Formülasyonlarda kullandığımız kitosan jellerin tek başına MRSA suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bulunmuştur (Tablo 4.13. ve Tablo 4.14.). Antimikrobiyal aktivitenin kullanılan kitosanın özellikleri (molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi, çözünürlük vb, elde edildiği kaynak), ortamın pH'sı, mikroorganizma tipine göre değiştiği bilinmektedir (307, 308). Benzer şekilde, çalışmamızda kullandığımız kitosanların özelliklerine göre ve kullanılan suşlara göre antibakteriyel aktivitede farklılıklar gözlenmiştir. Çalışmamızda düşük molekül ağırlığına sahip kitosan jellerin ATCC 43300'e karşı etkinliğinin daha az olduğu görülmektedir. Öte yandan, antimikrobiyal aktivite ile kitosan özellikleri arasındaki ilişki hakkında hala çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda, Gram negatif bakteriler için antibakteriyel aktivitenin azalan molekül ağırlığıyla arttığı, Gram pozitif bakteriler için ise antimikrobiyal aktivitenin artan molekül ağırlığıyla arttığı bildirilmiştir (309). Antimikrobiyal aktivite ile kitosanın moleküler ağırlığı arasındaki ilişkinin, belirtilen patojenin türünden etkilendiği kabul edilmektedir (310). Farklı molekül ağırlıklarına (150-5000 kDa) sahip kitosanların karşılaştırıldığı bir çalışmada, tüm suşlara karşı en etkili olarak yüksek molekül ağırlıklı kitosanın (500-5000 kDa) olduğu bulunmuştur (311). Bu çalışmada kullanılan yüksek molekül ağırlıklı kitosanın pH'sı, düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanın pH'sından daha düşük olduğundan, kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin pH'dan ters orantılı olarak etkilendiğini, kitosanın amino gruplarının protonlanarak kuaterner forma dönüştürülmesiyle daha düşük pH değerinde daha yüksek aktivite gözlemlendiğini göstermiştir. Bununla birlikte, kitosanın pH'sından daha yüksek pH değerine sahip suda çözünür kitosan türevlerinin, baz olarak gelişmiş antimikrobiyal aktivite gösterdiği gösterilmiştir (303, 312-314). Ayrıca, yapılan antimikrobiyal aktivite tayin yöntemine (örn. agar dilüsyon, sıvı dilüsyon) bağlı olarak, kitosanın antimikrobiyal aktivitesine ilişkin sonuçların farklılıklar göstereceği bildirilmiştir (315).

Kitosanın, yaygın olarak deri enfeksiyonlarına neden olan Gram-pozitif *S. aureus* çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Nanopartikül formundaki kitosan %10 ve %20 konsantrasyonlarda *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* ve

Enterococcus faecalis'in üremesini 24 ve 48 saatte tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir (316).

E. coli, *S. aureus*, *P. aeruginosa* üzerinde yapılan çalışmada, düşük molekül ağırlıklı kitosan için mikroorganizma çoğalmasını azaltmada gözlemlenen etkinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (306, 317, 318). Düşük molekül ağırlıklı kitosanın etkinliği küçük zincirlerin hareketliliği, çekimi ve iyonik etkileşimi büyük zincirlere göre daha kolaydır ve membran yüzeyine etkili bir bağlanma sağlamaktadır (304, 310).

TRSA2, TRSA8, TRSA45, TRSA45, TRSA32, TRSH1, TRSE6 ve MRSA4 suşları klinik izolat olması sebebiyle bu suşlara karşı kitosanların etkinliği literatürde henüz incelenmemiştir. MRSA4'e karşı kitosanın molekül ağırlığının artışına bağlı olarak etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Aynı molekül ağırlığına sahip kitosanların konsantrasyonunun artışına bağlı olarak ise pH'sı 5.0 olan kitosan jellerde (koyo ve protosan jel) aktivitede artış orta ve yüksek molekül ağırlıklı kiotsan jellerde (pH 4.0) aktivitede azalma gözlenmiştir. pH'sı 4.0 olan kitosan jellerin MRSA4'e karşı daha etkili olduğu görülmüştür. Benzer sonuçlar ATCC 43300 suşuna karşı da elde edilmiştir (Tablo 4.13. ve Tablo 4.14.).

Fusidik Asit İçeren Jeller

Fusidik asit için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından tanımlanmış sınır değerler olmamasına rağmen, *S. aureus*'a karşı fusidik asit için önerilen sınır değerler duyarlı türler için $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, dirençli türler için ise $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ olarak verilmiştir (319, 320). Duyarlı suşlara (ATCC 33862, ATCC 6538, TRSA2, TRSA8, TRSA45, TRSA32) karşı fusidik asit için elde edilen MİK değerleri sınır değerler arasında bulunmuştur. Fusidik asitin ATCC 43300'e karşı etkinliği incelendiğinde bir çalışmada MİK değeri $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ elde edilmiştir (321). Bir başka çalışmada ise yine ATCC 43300 suşuna karşı etkisi incelenmiş ve MİK değeri $1,563 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (322). Soe ve ark. (323) yaptığı bir çalışmada fusidik asitin ATCC 43300 suşuna karşı MİK değeri $0,03 \mu\text{g/mL}$ elde edilmiştir. Benzer bir sonuç Kyaw ve ark. (324) yaptığı çalışmada elde edilmiş olup, fusidik asitin ATCC 43300'e karşı MİK değeri $0,031 \mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. Fusidik asidin ATCC 43300'e karşı elde edilen $0,0009 \mu\text{g/mL}$ MİK değeri literatürle uyumlu bulunmuştur.

Fusidik asitin kitosan varlığında ATCC 33862, ATCC 6538, MRSA4 TRSA2 ve TRSA32 suşlarına karşı artmış antibakteriyel aktivite göstermiştir (Tablo 4.13.).

Fusidik asit içeren ticari krem formülasyonunun tüm *S. aureus* suşlarına karşı yüksek antibakteriyel aktivite (MİK <0,0006 µg/mL) göstermiştir. Ahmed ve ark.(325) yaptıkları bir çalışmada iki farklı krem formülasyonu (FA-NC-F12 ve FA-NC-F12/L) *S. aureus* (ATCC 29737) ve *S. epidermidis* (ATCC 12228)'e karşı antibakteriyel aktivitesi, farklı yöntemler kullanılarak değerlendirilmiş ve fusidik asit içeren ticari kremle karşılaştırılmıştır. Geliştirilen krem formülasyonları için ATCC 29737'a karşı 32 µg/mL MİK elde edilirken fusidik asit içeren ticari krem için >128 µg/mL MİK değeri elde edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürde bildirilen suşlarla kıyaslandığında fusidik asit içeren ticari kremin çalıştığımız suşlara daha etkili olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda %2, a/h fusidik asit içeren jel formülasyonlarının metisiline dirençli ve duyarlı suşlara karşı literatürde bildirilen antibakteriyel aktiviteden 10 kat daha etkili olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, %2 fusidik asit (a/h) yüklü polimer kısmını kitosan oluşturan lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin antibakteriyel aktivitesi, sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak MRSA 33591, MSSA 25921 ve SA 22359 suşlarına karşı test edilmiştir (326). Çözelti şeklinde olan fusidik asitin (%2, a/h) MRSA 33591, MSSA 25923 ve SA 22359'a karşı MİK değerleri sırasıyla $8,23 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$, $9,86 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ ve $21,0 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$ bulunmuştur. Lipit-polimer hibrit nanopartiküllere enkapsüle edilen fusidik asitin antimikrobiyal aktivitesinin MRSA 33591 ve MSSA 25923 karşı 4-5 katı arttığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda fusidik asit içeren ticari kremin incelenen tüm MRSA suşlarına karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği bulunmuştur (MİK <0,0006 µg/mL). Geliştirdiğimiz formülasyonlar da ticari kreme benzer bakteriyel aktiviteyi göstermiştir. Yapılan bir çalışmada çam yağı, Tween 80 ve Span 20 içeren nanoemülsiyon formülasyonuna % 2 a/h konsantrasyonda yüklenen fusidik asit veya sodyum fusidat farklı konsantrasyonlarda (%0,4 , % 0,6 , % 0,8 Karbopol) Carbopol 940 hidrojel ile birleştirilerek nanoemüljel formülasyonları geliştirilmiştir (298). *S. aureus* ve MRSA üzerinde antibakteriyel aktivitesi değerlendirilmiştir. Nanoemüljellerin, piyasadaki % 2 konsantrasyonda fusidik asit içeren krem (Fusilin krem) ve %2 konsantrasyonda sodyum fusidat içeren ticari merheme kıyasla

antibakteriyel aktivitelerinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bir başka çalışmada fusidik asitin transdermal taşınımı için su içinde yağ nanoemülsiyonu geliştirilmiştir. MRSA ve metisiline duyarlı *S. aureus*'a (MSSA) karşı antibakteriyel aktivitesi agar difüzyon yöntemi kullanılarak ticari krem ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. % 2 konsantrasyonda fusidik asit içeren ticari krem ile karşılaştırıldığında fusidik asit nanoemülsiyonu, antibakteriyel aktivitede önemli bir artış ($p < 0.05$) ve daha geniş bir inhibisyon zonu göstermiştir. Bu çalışmada nanoemülsiyon Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri ve mantarlara karşı anti-mikrobiyal aktiviteye sahip olduğu yaygın olarak bildirilen çay ağacı yağı ile hazırlanmıştır (327). Yapılan bir başka çalışmada antibakteriyel etkinliği daha yüksek bir ilaç taşıyıcı sistem için su içermeyen, püskürtülerek uygulanabilen lipid bazlı bir formülasyon geliştirilmiştir (328). Geliştirilen formülasyonun *S. aureus* (ATCC 29213)'a karşı fusidik asit içeren ticari kremden daha güçlü bir antibakteriyel etki sağladığı gösterilmiştir.

Sodyum Fusidat İçeren Jel Formülasyonları

Sodyum fusidatın kitosan jel formülasyonu içinde dirençli ve duyarlı tüm suşlara karşı antibakteriyel aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir araştırmada, pamuklu gazlı beze antibakteriyel özellikler kazandırmak için sodyum fusidat yüklü mikrokapsüller kullanılmıştır (329). Mikrokapsüller, çekirdek olarak etanol içinde çözülmüş sodyum fusidat ve kabuk olarak kalsiyum aljinat ile hazırlanmıştır. Mikrokapsüller daha sonra %1'lik bir kitosan çözeltisine yüklenerek steril pamuklu gazlı bez kumaş bu süspansiyona emdirilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Gazlı bez örneklerinin antibakteriyel özellikleri Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere direnç açısından test edilmiştir. Numuneler, ortalama yalnızca Gram-pozitif bakterilere (*S. aureus*) karşı antibakteriyel özellikler göstermiştir. Yaptığımız çalışmalarda fusidik asit ve sodyum fusidat içeren kitosan bazlı jel formülasyonları antibakteriyel etkinliği gram-pozitif bakterilere karşı incelenmiş olup geliştirilen tüm formülasyonların aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Cevher ve ark. (330), yapmış olduğu çalışmada, değişen polimer:ilaç oranlarıyla (1:1, 2.5:1, 5:1) sodyum fusidat içeren poli(D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) mikroküreler hazırlanmış olup kronik osteomyelitin lokal tedavisi için etkinliğini değerlendirilmiştir. MRSA ilişkili osteomyelitte sodyum fusidat yüklü

mikrokürelerin etkili olduğu bulunmuştur. Çalışmalarımızda sodyum fusidat yüklü jel formülasyonlarının metisiline dirençli ATCC 43300 ve MRSA4 suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesinin yüksek olduğu gösterilmiştir.

Sodyum fusidat içeren kitosan jel formülasyonları sodyum fusidat içeren ticari merhem ile karşılaştırıldığında tüm suşlara karşı daha yüksek bir antibakteriyel aktivite göstermiştir. Fusidik asit içeren ticari krem ve geliştirilen jel formülasyonları kıyaslandığında ticari kremin kadar etkili olduğu gösterilmişken sodyum fusidat içeren jel formülasyonlarının tüm suşlara karşı sodyum fusidat içeren ticari merheme göre çok daha yüksek aktivite sergilediği görülmektedir.

Endolizin İçeren Jeller

LysSA10, Kılıç ve ekibi tarafından rekombinant olarak üretilmiş endolizin olup *S. aureus*, *MRSA*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* suşlarına karşı daha önce yapılan çalışmalarda antibakteriyel aktivitesi gösterilmiştir (228). LysSA10'un formülasyon çalışması ilk kez bu tezde incelenmiştir. Kitosan bazlı jel formülasyonunun antibakteriyel aktivitesi metisiline duyarlı ve metisiline dirençli suşlara (ATCC 33862, ATCC 43300, ATCC 6538, MRSA4, TRSA2, TRSA8, TRSA45, TRSA32, TRSH1 ve TRSE6) karşı incelenmiştir. En yüksek antibakteriyel aktiviteyi TRSA8 ve TRSH1'e karşı göstermiştir.

Çalışmamızda sadece endolizin ile endolizin yüklü koyo kitosan jelin antibakteriyel aktivitesi karşılaştırıldığında metisiline dirençli suşlara (ATCC 43300 ve MRSA4) karşı endolizinin antibakteriyel aktivitesinin arttığı görülmüştür (Tablo 4.13 ve Tablo 4.14.). Kaur ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Faj MR-5'ten üretilen bir endolizin olan LysMR-5'in MRSA'ya karşı yüksek aktivite gösterilmiş ve aljinat-kitosan nanopartikülleri (Alg-Chi NP'ler) LysMR-5 için ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır (331). Boş Alg-Chi Np'lerin, LysMR-5 yüklenmesiyle MRSA'ya karşı artmış antibakteriyel aktivite gözlenmiştir. Gondil ve ark. (332) yaptıkları bir çalışmada bir muramidaz olan Cpl-1 endolizini kitosan nanopartiküllerine yüklenerek erkek Balb/c farelerin akciğerlerinde *Streptococcus pneumoniae* suşuna karşı incelenmiş ve yalnızca Cpl-1 ve kitosan nanopartikülleri ile tedavi edilen hayvanlara kıyasla bakteriyel yükün en düşük olduğu aktivitenin en yüksek olduğu bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada *E. coli*'den elde edilen rekombinant kimerik endolizinin

antibakteriyel aktivitesini iyileştirmek için kitosan kaplı metal-organik nanokompozit geliştirilmiş ve litik aktivitesi ve sinerjistik etkisi *E. coli*, *S. aureus*, ve *P. aeruginosa* suşlarına karşı incelenmiştir (333). Kimerik endolizinin, özellikle nanopartiküllerle birlikte kullanıldığında, çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri türlerine karşı etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Kitosan, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve immünojenik olmayan yapısı nedeniyle endolizinin taşınması için diğer polimerlere göre daha çok tercih edilmektedir (217, 219).

Endolizin +Fusidik Asit İçeren ve Endolizin+ Sodyum Fusidat Jeller

Antibakteriyel aktivite sonuçları incelendiğinde endolizin+fusidik asit kombinasyonunun ve endolizin+ sodyum fusidat içeren jellerin ATCC 43300 ve MRSA 4 suşlarına karşı antibakteriyel etkinliğinin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde endolizinin antibiyotiklerle birlikte kullanıldığında sinerjik etki gösterdiğini bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (334). Schunch ve ark. (335), yaptıkları bir çalışmada metisiline dirençli *S. aureus* 120 izolat da dahil olmak üzere test edilen 250 *S. aureus* suşuna karşı CF-301 endolizinin, vankomisin veya daptomisin ile kombinasyonlarını incelemiş ve sinerjik etki gösterdiği ve tek başına antibiyotiklerle göre sağkalımı önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir. Djurkovic ve ark. (336) tarafından yapılan bir çalışmada pnömokokal lizin Cpl-1 gentamisin ile kombine edildiğinde artmış etki gösterdiği bildirilmiştir. Benzer şekilde stafilokoklara spesifik enzim ve glikopeptit antibiyotik kombinasyonu ile sinerjistik etki gözlenmiştir (337).

5.2.3. Hücre Canlılığı

Boş kitosan jellerin 24. ve 48. saatin sonunda hücre canlılığının %80'nin üzerinde olduğu ve kitosan jellere etkin madde (fusidik asit veya sodyum fusidat) yüklendiğinde de hücre canlılığında önemli azalma gözlenmediği görülmüştür. Thakur ve ark. (338) yaptıkları çalışmada, fusidik asit ve fusidik asit içeren nanoemülsiyon jel formülasyonunun insan keratinosit hücrelerinde 100 µg/mL'ye kadar hücre canlılığına bir etkisi olmadığını göstermiştir (338). Fusidik asit içeren jel formülasyonlarının 24. saatte hücre canlılığı üzerine etkisi olmadığı gösterilmiş olup literatür çalışmalarıyla uyumlu bulunmuştur. Sodyum fusidatın tek başına etkili

olduğu konsantrasyonda ve kitosan jeller varlığında 24. ve 48. saatte hücre canlılığı üzerine etkisi yoktur. Sodyum fusidat ile L929 hücrelerinde yapılan bir çalışmada hücre canlılığını etkilemediği gösterilmiştir (339).

Endolizinin tek başına ve koyo kitosan jel içinde hücre canlılığı yüksek bulunmuştur. Daha önce Kılıç ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, LysSA10 endolizini hücre canlılığını etkilemediği insan fibroblast hücreleri üzerinde gösterilmiştir (228). Endolizin+ fusidik asit kombinasyonu ve endolizin+ sodyum fusidat kombinasyonuna hücre canlılığında azalma gözlemlenmiş olup bu kombinasyonların koyo kitosan jel varlığında hücre canlılığında artış gözlenmiştir (Şekil 4.14.).

5.3. In Vivo Çalışmalar

In vivo çalışmalarımızda subkütan enjeksiyon hayvan modeli kullanılmış olup subkütan enjeksiyonda çoğunlukla kullanılan *S.aureus* suşu olan klinik izolat olan Metisiline dirençli *S. aureus* 4 (MRSA4) suşu kullanılmıştır. Yara iyileşmesinin in vivo olarak değerlendirilmesinde farklı hayvan modelleri ve farklı yara oluşturma yöntemleri (eksizyon, tape strip, yanık, punch biyopsi vb) kullanılmaktadır (184, 187, 189, 193, 195). Bunların içinde en sıklıkla kullanılan yöntem subkütan enjeksiyon yöntemidir. Yara iyileşmesi, hemostaz, enflamatuvar faz, proliferatif veya fibroblast fazı ve yara kontraksiyonunu içeren dokunun yeniden şekillenmesi olmak üzere dört aşamada gerçekleşmektedir (340). Subkütanöz enjeksiyon modeli, deri altı apseler dahil daha invaziv enfeksiyonları taklit etmektedir. Farelerin sırtlarına *S. aureus*'un deri altı aşılması üzerine, bu bakterinin etrafında nötrofillerden oluşan derin bir apse oluşur. Bu nedenle, bu model *S. aureus* ve *Streptococcus pyogenes* gibi çeşitli bakteri türleriyle oluşan derin yumuşak doku enfeksiyonlarına karşı bağışıklık mekanizmalarını açıklamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (341). Bu modeli kullanarak enfekte ve tedavi edilen derinin histopatolojik incelemesi, enflamasyon mediyatörlerinin üretimini ($TNF\alpha$, $IL1\beta$, IL-6 ve IL17a sitokinleri, MPO aktivitesi) ve bakteri yükü incelenmiştir. Yapılan ön çalışmalarla incelenen iki suştan MRSA4 suşunun 1×10^8 CFU/mL konsantrasyonda kullanılmasına karar verilmiştir. Subkütan enjeksiyon sonrasında yara oluşumu için 3 - 4 gün içinde beklenmektedir (265, 266).

Bizim yaptığımız ön çalışmalarda da 3. günün sonunda ATCC 43300 ve MRSA4 uygulanan gruplarda açık yara ve/veya apse oluşumu görülmüştür.

Seçtiğimiz modelin geçerliliğini ve koşullarını belirledikten sonra formülasyonlarla çalışmalara geçilmiştir. İn vitro çalışmalarımızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda seçtiğimiz uygun formülasyonlarla in vivo çalışmalara gerçekleştirilmiştir. Her bir etkin madde için tek iki formülasyon seçilmiş olup, bu formülasyonlar kontrole karşı incelenmiştir. Ayrıca ticari ürünler de karşılaştırma amacıyla gruplara dahil edilmiştir.

5.3.1. Fusidik Asit İçeren Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi

İN vivo çalışmalar için fusidik asit içeren % 3 konsantrasyonda koyo kitosan jel (FA + gK3) ve fusidik asit içeren %3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jel (FA + gM3) formülasyonları seçilmiştir. Bu formülasyonların kontrol grupları olarak fusidik asit çözeltisi (FAsol) , boş %3 konsantrasyonda kitosan jel (gK3) ve boş %3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı jeller (gM3) kullanılmıştır. Piyasa preparatı olarak ise fusidik asit içeren ticari krem (Fuidin krem, Abdi İbrahim) kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak uygulama yapılmayan enfekte fare grubu kullanılmıştır.

Kitosan jellerin tek başına yara iyileşmesinde kontrole göre etkili olduğu görülmüştür. Etkin madde ile inkoprpor edildiğinde ise yara iyileşmesini hızlandırdığı görülmüştür. Kitosanlar arasında incelenen parametreler karşılaştırıldığında, parametreler arasında bazı farklılıklar görülmesine karşın, molekül ağırlığı veya konsantrasyon yönüyle yara iyileşmesinde anlamlı fark bulunmamıştır.

Fusidik asit çözeltisi tek başına uygulanan gruplarda enfeksiyon sonrası 6. günde iyileşme gözlemlenmiştir. Fusidik asit çözeltisinin etanolde hazırlanmış olması nedeniyle lezyon alanı üzerinde hızlı etki göstermiş olduğu düşünülmektedir. Zira fusidik asit içeren ticari krem uygulanan grupta iyileşme enfeksiyon sonrası 11. günde görülmüştür. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel uygulanan grupta enfeksiyon sonrası 9. gün sonunda, fusidik asit içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel uygulanan grupta enfeksiyon sonrası 10. günün sonunda lezyonun iyileştiği görülmektedir. Bu durum kitosan ile geliştirilen jel formülasyonlarının fusidik asidin ticari ürüne göre yara iyileşme üzerine etkisini arttırdığını göstermiştir. Fusidik asit içeren koyo kitosan jelin,

fusidik asit içeren orta molekül ağırlıklı jelle göre lezyon alanını daha hızlı iyileştirdiği gösterilmiştir.

Enflamatuvar yanıtlarına temel olarak akut ve kronik olmak üzere iki olayla ilişkilidir ve her biri farklı mekanizmalarla tetiklenmektedir. Akut enflamasyonda doğal immün hücreleri, immün sistem savunmasının ilk hattını oluşturur ve adaptif immün yanıt tepkilerinin aktivasyonunu düzenlemektedir (342). Kronik enflamasyon, akut enflamatuvar mekanizmaların doku hasarını ortadan kaldırmada başarısız olduğunda ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda elde edilen apse alanları akut enflamasyonun bir göstergesidir. Ülser ise epidermisin ve sıklıkla dermisin bazı kısımlarının tamamen kaybolduğu deri bütünlüğünün bozulması olarak bilinmektedir. Derideki ülser oluşumu ise kronik enflamasyon belirteçidir. Enfekte dokularda MPO aktivitesi artmaktadır (269, 343). Histopatolojik değerlendirmeler, bakteriyel yük, akut ve kronik enflamasyon sonuçları formülasyon uygulamasıyla azaldığını göstermiştir. Sitokin düzeyleri de bunu desteklemiştir. Apsenin küçülmesiyle birlikte hücre ve dokularda enflamasyon veya hasarın ilk belirtisi olarak nötrofillerden salgılanan miyeloperoksidaz aktivitesinin de azaldığı gözlemlenmiştir. Bununla ilişkili olarak apse alanının küçülmesi bakteriyel yükte azalmaya böylelikle de miyeloperoksidaz aktivitesinin de düşmesini sağlamaktadır (344). Yara iyileşmesi üzerine formülasyonlarda incelenen farklı kitosanlar etkisi görülmemiştir. Kitosan ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilmiştir (212, 213).

S. aureus'a karşı kutanöz immün yanıt hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemini içermektedir (345). Doğuştan gelen bağışıklık sistemi nötrofil ve makrofaj fagositozu veya kompleman aktivasyonu gibi spesifik olmayan bir proinflatuar yanıt olarak kabul edilirken, edinsel immün yanıtın, antijenlerin B ve T lenfositleri tarafından tanınmasıyla yönlendirilen (antikor ve hücre aracılı immün yanıtlar) oldukça spesifik bir yanıt olduğu kabul edilmektedir

Nötrofillerin dolaşımdan *S. aureus* enfeksiyonunun derideki bir bölgesine toplanması, patojenin Patern Tanıma Reseptörleri (PRR'ler) tarafından tanınmasını ve IL-1 α , IL-1 β , TNFa ve IL-6 gibi proinflatuar sitokinlerin üretimini/salgılanmasını içermektedir (346). Monositik hücreleri, doğal bağışıklık için gereklidir. Monositler/makrofajlar, septik şoktan sorumlu inflamatuvar sitokinlerin ana kaynağıdır. Enflamasyon ve septik şokta rol oynayan farklı sitokinler arasında TNF-a,

interlökin-1 β (IL-1 β) ve IL-6 proinflamatuvar sitokinlerdir (346). *S. aureus*'a karşı bağışıklık için nötrofil alımı gerekli olmasına rağmen, T hücrelerinin bir rolü olduğu ileri sürülmektedir. *S. aureus* kutanöz enfeksiyonuna karşı doğal bağışıklıkta IL-17 üreten epidermal $\gamma\delta$ T hücrelerinin de rolü olduğu bildirilmiştir (347). Dolaşımdan nötrofil toplanmasına, proinflamatuvar sitokinler (IL-1a, IL-1 β , tümör nekroz faktörü (TNF) ve IL-6 gibi) ve kemokinler dahil olmak üzere birçok faktör aracılık etmektedir (348). Tümör nekroz faktörü-a (TNF α), enflamasyona, immün yanıtta ve apoptoza aracılık eden çok işlevli bir sitokindir (349).

S. aureus enfeksiyonlarının ayırt edici özelliği, bakteriyel klirens için gerekli olan nötrofil apsesi oluşumudur. Nötrofillerin derideki *S. aureus* enfeksiyonu bölgesine toplanması, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin PRR'leri tarafından patojenin tanınmasını ve ardından pro-inflamatuvar bağışıklık tepkilerinin başlatılmasını içermektedir. Sitokin düzeyleri incelendiğinde hayvanlardaki TNF α ekspresyonu en az olan grup fusidik asit çözeltisi (FAsol) uygulanan hayvan grupları olup lezyon iyileşmesinin enfeksiyon sonrası 6. günde tamamlanmış olması ve MPO aktivitesinin düşük elde edilmesiyle bağlantılı olduğu görülmüştür. Fusidik asit eklendiğinde TNF α ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Fusidik asit içeren ticari krem uygulanan grupta TNF α geliştirilen formülasyonlarla benzer ekspresyon göstermiştir.

Formülasyonların uygulandığı gruplarda MRSA ile enfekte deri lezyonlarında TNF α ve IL-6 ekspresyonunun önemli ölçüde azalmıştır. Benzer sonuçlar farklı etkin maddeler için de bildirilmiştir (350).

IL-17, Th17 sitokinlerinin önemli bir üyesidir (351). Geliştirdiğimiz formülasyonlarda IL17a ekspresyonunun başlangıca göre azaldığı, enflamasyon üzerinde azaltıcı etkisi olduğu görülmüştür. Ticari ürün ile ise IL-17a düzeyleri daha yüksek olup, daha düşük etki görülmüştür.

Hem IL-1 α hem de IL-1 β 'nin *S. aureus* deri yarası enfeksiyonu sırasında konak savunmasına katkıda bulunduğu ve IL-1 β 'nin daha derin intradermal *S. aureus* deri enfeksiyonu sırasında daha kritik rolü olduğu bildirilmiştir (352). IL-1 β yanıtı, konakçı savunması için daha kritik bir belirleyici olmaktadır. IL1 β düzeyleri incelendiğinde, formülasyonlarımızın sitokin ekspresyonunu azalttığı, görülmüştür. Daha yüksek

sitokin ekspresyonu görülen ticari ürün grubuna göre, formülasyonumuzun enflamasyona karşı daha etkili olduğu görülmüştür.

5.3.2. Sodyum Fusidat İçeren Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi

İn vivo çalışmalar için sodyum fusidat içeren % 3 konsantrasyonda koyo kitosan jel (SF + gK3) ve sodyum fusidat içeren %3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3) formülasyonları seçilmiştir. Bu formülasyonların kontrol grupları olarak sodyum fusidat çözeltisi (SFsol) , boş %3 konsantrasyonda kitosan jel (gK3) ve boş %3 konsantrasyonda orta molekül ağırlıklı jeller (gM3) kullanılmıştır. Piyasa preparatı olarak ise fusidik asit içeren ticari merhem (Fucidin merhem, Abdi İbrahim) kullanılmıştır. Bununla birlikte pozitif kontrol grubu olarak uygulama yapılmayan enfekte fare grubu kullanılmıştır.

Sodyum fusidat çözeltisi (SFsol) uygulanan grupta enfeksiyon sonrası 11. güne kadar lezyonda iyileşme görülmemiştir (Şekil 4.26.). Sodyum fusidatın koyo kitosan jel (SF + gK3) varlığında enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda lezyonu iyileştirdiği gözlemlenmiş olup sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF+gM3) uygulanan gruplarda yara enfeksiyon sonrası 11. günün sonuna kadar iyileşmemiştir. Benzer şekilde Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta apsenin iyileşmediği görülmektedir.

Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF+ gK3) ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3), sodyum fusidat içeren ticari merhem ve sodyum fusidat çözeltisi uygulanan hayvan gruplarında deney süresince hayvan ağırlıklarında değişiklik olmamıştır.

Sodyum fusidatın koyo ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel varlığında lezyon alanlarında enfeksiyon sonrası 9. günden sonra azalma olduğu görülmüş olup lezyon görüntülerinde bu azalma gözlenmiştir. İki formülasyon arasında uygulanabilirlik açısından sodyum fusidat içeren koyo kitosan jelin daha iyi olduğu görülmektedir. Sodyum fusidat orta molekül ağırlık varlığında lezyona uygulandığında uygulama tekrarlanmaya başladığında deride biriktiği gözlemlenmiş olup yaranın hava almamasını ve uygulanan bir diğer formülasyonun apse alanı ile etkileşmemesine sebep olmuştur.

Histopatolojik olarak incelendiğinde, akut enflamasyonun sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlığında kitosan jeli (SF + gM3) ve sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF+gK3) uygulanan hayvanlarda akut enflamasyondaki azalma görülmüş olup akut enflamasyon skoru benzer elde edilmiştir. Boş koyo kitosan jel (gK3) ve sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) uygulanan gruplarda kronik enflamasyon skoru sodyum fusidatın koyo kitosan jel ile uygulanmasının kronik enflamasyon üzerindeki etkisinin boş kitosan jeli benzer olduğu gözlenmiştir. Sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF+ gM3) uygulanan grupta kronik enflamasyon skorunda azalma görülmüştür. akut enflamasyonun sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlığında kitosan jeli (SF + gM3) ve sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF+gK3) uygulanan hayvanlarda akut enflamasyondaki azalma görülmüş olup kronik enflamasyon skoru benzer elde edilmiştir. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel uygulanan gruplarda apse alanı benzer elde edilmiştir. Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel uygulanan grupların diğer formülasyonlara göre apse alanını daha çok azalttığı görülmüştür.

Sodyum fusidat içeren merheme ait akut ve kronik enflamasyon skorları geliştirilen formülasyonlara göre daha yüksek elde edilmiştir. Apsel alanı da daha büyük elde edilmiştir. Bu durumda geliştirdiğimiz formülasyonların sodyum fusidat içeren ticari merheme göre daha etkili olduğu görülmüştür.

Bakteriyel yük değerleri incelendiğinde sodyum fusidat çözeltisi uygulanan grupta neredeyse enfekte dozu kadar bakteriyel yüke sahip olduğu görülmüştür. Akut ve kronik enflamasyon skorunun yüksek olması da durumu açıklamaktadır. Enfeksiyon sonrası 11. güne kadar lezyon alanının azalmaması ve lezyon iyileşmenin tamamlanmaması da bunun bir göstergesidir.

Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF + gK3) uygulanan grupta bakteriyel yük hem boş koyo kitosan jel uygulanan gruba hem de sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jeli göre daha düşük bir bakteriyel yüke sahiptir. Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta bakteriyel yük neredeyse enfekte dozu kadar elde edilmiş olup sodyum fusidat içeren koyo kitosan jelin daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Sodyum fusidatın koyo ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel varlığında MPO aktivitesi kitosan jele göre daha azdır. Sodyum fusidat içeren ticari merhem ile geliştirdiğimiz jel formülasyonlarının MPO aktivitesi üzerinde etkisi benzer bulunmuştur.

Sodyum fusidat (SFsol) uygulanan hayvan gruplarında TNF α ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir. Bakteriyel yük, akut ve kronik enflamasyon, lezyon alanı ve lezyonların iyileşmesi göz önünde bulundurulduğunda enfeksiyonun hala devam ettiği sitokin düzeyinde de gösterilmiştir. Sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3) uygulanan grupta sodyum fusidat içeren koyo kitosan jele göre daha fazla ekspresyon gözlenmiştir. Bu durumda koyo kitosan jel orta molekül ağırlıklı kitosan jele göre enflamasyonu daha fazla azalttığını göstermektedir. Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta TNF α ekspresyonu geliştirilen formülasyonlara göre yüksek bulunmuştur.

Benzer şekilde sodyum fusidat (SFsol) uygulanan hayvan gruplarında IL-6 ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir. Sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3) uygulanan grupta sodyum fusidat içeren koyo kitosan jele göre daha fazla ekspresyon gözlenmiş olup koyo kitosan jel orta molekül ağırlıklı kitosan jele göre enfekte dokuda daha az IL-6 ekspresyonu sağlayarak enflamasyonu daha iyi azalttığı gözlemlenmiştir. Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta IL-6 sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel ticari merhem ile benzer bulunmuştur.

Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF+gK3) uygulanan grupta IL-17a ekspresyonunda sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3) uygulanan gruba göre daha az ekspresyon gözlenmiştir. Bu durumda koyo kitosan jel orta molekül ağırlıklı kitosan jele göre enfekte dokuda daha az IL-17a ekspresyonu sağlayarak enflamasyonu daha iyi azalttığını göstermektedir. Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan grupta IL-17a yüksek oranda eksprese olmuş olup sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel ticari merhem göre daha etkilidir.

Sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel (SF+gK3) uygulanan grupta IL1 β ekspresyonunda sodyum fusidat içeren orta molekül ağırlıklı kitosan jel (SF + gM3) uygulanan gruba göre daha az ekspresyon gözlenmiştir. Bu durumda koyo kitosan jel orta molekül ağırlıklı kitosan jele göre enfekte dokuda daha az IL1 β ekspresyonu

sağlayarak enflamasyonu azalttığı görülmektedir. Sodyum fusidat içeren ticari merhem uygulanan gruba göre sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel ticari merhem ile karşılaştırıldığında enflamasyondaki etkinliği çok daha yüksektir.

5.3.3. Endolizin İçeren Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi

Endolizin içeren çözelti ile yara iyileşmesi görülmezken, jel formülasyonu içinde uygulandığında (LysSA10 + gK3) ile enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda lezyonun tamamen kapandığı görülmüştür. Fusidik asit ve sodyum fusidat formülasyonları ile karşılaştırıldığında, endolizin içeren koyo kitosan jelle ait akut enflamasyonu gösteren bir bulgu bulunamamıştır. Endolizin içeren koyo kitosan jelin, fusidik asit ve sodyum fusidat içeren jellerle karşılaştırıldığında akut enflamasyonda daha etkili olduğu görülmüştür. Kronik enflamasyon skoru fusidik asit içeren koyo kitosan jel, sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel ve orta molekül ağırlıklı kitosan jel ile benzer elde edilmiştir. Apse alanı gözlenmemiştir. Apsel alanının gözlenmemesi, lezyonun tamamen iyileşmesi ve akut enflamasyon görülmemesi endolizin içeren koyo kitosan jelin yara iyileşmesi üzerinde etkisinin yüksek olduğu söylenebilir.

Endolizin içeren koyo kitosan jelin (LysSA10 + gK3) bakteriyel yük sonuçları endolizin çözeltisi (LysSA10) ve boş koyo kitosan jel (gK3) ile karşılaştırıldığını endolizin içeren koyo kitosan jel uygulanan hayvanlarda bakteriyel yük oldukça düşük elde edilmiş olup bakteriyel yük sonuçları diğer bulguları da desteklemektedir. Endolizinin koyo kitosan jel varlığında MPO aktivitesi endolizin tek başına uygulanan gruptakinden fark olmadığı görülmüştür. Ancak boş koyo kitosan jel ile karşılaştırıldığında aktivitede bir azalma gözlemlenmiştir.

Endolizinin koyo kitosan jel varlığında TNF α ekspresyonunu azaltmış olup enflamasyonda endolizin çözeltisine ve boş kitosan jelle göre daha etkili olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde Endolizinin koyo kitosan jel varlığında IL-6 ekspresyonunu azaltmış olup enflamasyonda endolizin çözeltisine ve boş kitosan jelle göre daha etkili bulunmuştur.

IL-17a endolizin içeren koyo kitosan jel (LysSA10+gK3) uygulanan grupta endolizinin koyo kitosan jel varlığında ekspresyonunu azaltmış olup enflamasyonda endolizin çözeltisine ve boş kitosan jelle göre daha etkili bulunmuştur.

Endolizin çözeltisi (LysSA10) uygulanan hayvan gruplarında IL1 β ekspresyonu azalmış olup enflamasyonda endolizin çözeltisine ve boş kitosan jele göre daha etkilidir bulunmuştur.

5.3.4. Endolizin + Fusidik Asit İçeren Jel Formülasyonların İn Vivo Değerlendirmesi

İn vivo çalışmalar için endolizin + fusidik asit içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + FA + gK3) seçilmiştir. Bu formülasyonun kontrol grupları olarak endolizin çözeltisi (LysSA10), boş %3 konsantrasyonda kitosan jel (gK3) ve fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3) kullanılmıştır.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonunu içeren %3 konsantrasyonda kitosan jel (LysSA10 + FA + gK3) uygulanan grupta yara enfeksiyon sonrası 11. gün sonunda tam iyileşme görülmüştür. Endolizin ve fusidik asitin %3 konsantrasyonda koyo kitosan jele eklenmesiyle lezyon alanının iyileşmesi hızlanmıştır. Fusidik asit içeren koyo kitosan jel (FA + gK3) uygulanan grupta iyileşme enfeksiyon sonrası 9. günde başlamış olup endolizinin varlığında iyileşme süreci hızlanmıştır.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren koyo kitosan jel (LysSA10 + FA + gK3) uygulanan hayvan gruplarında deney süresince hayvan ağırlıklarında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren koyo kitosan jel uygulanan grupta enfeksiyon sonrası 6. günden sonra lezyon alanlarında azalma görülmüştür. Bu azalma enfeksiyon sonrası 11. güne kadar devam etmiş olup lezyonların iyileşmesiyle benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içerek koyo kitosan jelin akut ve kronik enflamasyon değerleri, boş koyo kitosan jel, fusidik asit içeren koyo kitosan jel ve sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel uygulanan gruplar ile benzer elde edilmiş olup apse alanı üzerinde fusidik asit içeren koyo kitosan ve orta molekül ağırlıklı kitosan jelin daha etkili olduğu görülmüştür.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonunu içeren koyo kitosan jel formülasyonuna ait bakteriyel yük ile kontrol grupları arasında fark olmadığı (fusidik asit içeren koyo kitosan jel ve endolizin çözeltisi) görülmüştür.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren koyo kitosan jel formülasyonuna boş koyo kitosan jelin MPO aktivitesi ile karşılaştırıldığında aktivitede azalma gözlemlenmiştir. Bu durumda kitosan jel endolizin ve fusidik asit kombinasyonu ile birlikte MPO aktivitesini azaltmıştır.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan grubunda TNF α ekspresyonu fusidik asit içeren koyo kitosan jel ile karşılaştırıldığında daha az TNF α ekspresyonu olduğu gözlenmiştir.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan grubunda IL-6 ekspresyonu fusidik asit içeren koyo kitosan jel ile karşılaştırıldığında benzer etkileri olduğu gözlenmiştir.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan grubunda IL-17a ekspresyonu fusidik asit içeren koyo kitosan jel ile karşılaştırıldığında benzer IL-17a ekspresyonu ile benzer etkileri olduğu gözlenmiştir.

Endolizin ve fusidik asit kombinasyonu içeren jel uygulanan hayvan grubunda IL1 β ekspresyonu fusidik asit içeren koyo kitosan jel ile karşılaştırıldığında daha az IL1 β ekspresyonu ile daha etkili olduğu gösterilmiştir.

5.3.5. Endolizin+Sodyum Fusidat İçeren Formülasyonların İn Vivo Değerlendirilmesi

İN vivo çalışmalarda incelenen %3 konsantrasyonda koyo kitosan jel içinde hazırlanan endolizin+sodyum fusidat formülasyonu (LysSA10 + SF + gK3) ile 1 enfeksiyon sonrası 7. günde yara iyileşmesi görülmüştür. Genel olarak akut ve kronik enflamasyon skorları ve apse alanları diğer formülasyonlarla benzerlik göstermiştir. MPO aktivitesi, bakteriyel yük oranı ve sitokin düzeyleri değerlendirildiğinde, tek başına sodyum fusidat içeren formülasyona göre yara iyileşmesinin daha etkili ve hızlı olduğu görülmüştür.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Hem beşeri hem de veteriner alanda (özellikle kedi ve köpeklerde) MRSA kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde topikal yolla uygulanacak antibiyotik direncine karşı etkisi artırılmış antibiyotik, endolizin ve endolizin+antibiyotik kombinasyonu içeren biyogeçimli bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu amaçla seçilen antibiyotik fusidik asit ve sodyum fusidat, endolizin olarak LysSA10 ve bunların kombinasyonu kullanılmıştır.
- Uygulama kolaylığı olan, kendisinin örtücü etkisi olan jel formülasyonu seçilmiştir.
- Jellerin hazırlanmasında biyogeçimli, kendisinin penetrasyon artırıcı, antimikrobiyal, yara iyileştirici özellikleri olan katyonik bir biyopolimer olan kitosan kullanılmıştır
- MRSA kaynaklı deri enfeksiyonlarının tedavisinde etkinliği artırılmış, uygulama bölgesinde hemen uzaklaşmayan, enfeksiyon lezyonlarının iyileşmesini hızlandıran kolay uygulanabilen, stabilitesi yüksek biyogeçimli bir topikal ilaç formülasyonu geliştirilmiştir.
- LysSA10 endolizin için bu çalışma ile ilk defa bir formülasyon geliştirilmiş ve gerek formülasyon ile gerekse antibiyotik kombinasyonu ile etkinliğinin artırıldığı gösterilmiştir.
- In vitro ve in vivo sonuçlar incelendiğinde en uygulanabilir ve en etkili formülasyon sodyum fusidat içeren koyo kitosan jel formülasyonudur.

İleriye yönelik çalışmalarda, geliştirdiğimiz ilaç taşıyıcı platformun AMR'ye karşı antibiyotiklere alternatif farklı etkin maddeler (ör. Antimikrobiyal peptitler, farklı endolizinler vb) için etkinliğinin gösterilmesi üzerine çalışmalar planlanabilir. Ayrıca farklı enfeksiyonlara karşı farklı bölgelerde uygulanabilirliği araştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Lee HJ, Kim M. Skin Barrier Function and the Microbiome. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):13071.
2. de Szalay S, Wertz PW. Protective Barriers Provided by the Epidermis. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):3145.
3. Yang Y, Huang J, Zeng A, Long X, Yu N, ve ark. The role of the skin microbiome in wound healing. *Burns Trauma.* 2024;12:tkad059.
4. Zhu Y, Yu X, Cheng G. Human skin bacterial microbiota homeostasis: A delicate balance between health and disease. *mLife.* 2023;2(2):107-20.
5. Balkrishnan R, Manuel J, Feldman SR, Rapp SR. Measurement of health-related quality of life (HRQOL) associated with skin disease. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(1):3-4.
6. Hay RJ, Johns NE, Williams HC, Bolliger IW, Dellavalle RP, ve ark. The Global Burden of Skin Disease in 2010: An Analysis of the Prevalence and Impact of Skin Conditions. *J Invest Dermatol.* 2014;134(6):1527-34.
7. Clebak KT, Malone MA. Skin Infections. *Prim Care.* 2018;45(3):433-54.
8. Sukumaran V, Senanayake S. Bacterial skin and soft tissue infections. *Aust Prescr.* 2016;39(5):159-63.
9. Zaidi Z, Hussain K, Sudhakaran S. *Treatment of Skin Diseases: A Practical Guide.* Switzerland: Springer International Publishing; 2018.
10. Doron S, Gorbach SL. Bacterial infections: overview. *International Encyclopedia of Public Health.* 2008:273–82.
11. Soni J, Sinha S, Pandey R. Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes. *Front Microbiol.* 2024;15:1370818.
12. Lazar V, Oprea E, Ditu L-M. Resistance, Tolerance, Virulence and Bacterial Pathogen Fitness—Current State and Envisioned Solutions for the Near Future. *Pathogens.* 2023;12(5):746.
13. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet.* 2022;400(10369):2221-48.
14. Cuny C, Layer-Nicolaou F, Werner G, Witte W. A look at staphylococci from the one health perspective. *Int J Med Microbiol.* 2024;314:151604.
15. Hatlen TJ, Miller LG. Staphylococcal Skin and Soft Tissue Infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2021;35(1):81-105.
16. Boos MD, Sidbury R. 93 - Infections of the Skin. Gleason CA, Sawyer T, editors. *Avery's Diseases of the Newborn (Eleventh Edition).* Philadelphia: Elsevier; 2024.

17. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603-61.
18. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, et al. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(12):751-62.
19. Rayner C, Munckhof WJ. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by Staphylococcus aureus. *Intern Med J.* 2005;35 Suppl 2:S3-16.
20. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med.* 2017;90(1):135-45.
21. Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. *Br Med J.* 1961;1(5219):124.
22. Trent RJ. 8 - INFECTIOUS DISEASES. Trent RJ, editor. *Molecular Medicine (Third Edition)*. Burlington: Academic Press; 2005.
23. Tenover FC, McDougal LK, Goering RV, Killgore G, Projan SJ, et al. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol.* 2006;44(1):108-18.
24. Faires MC, Tater KC, Weese JS. An investigation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in people and pets in the same household with an infected person or infected pet. *J Am Vet Med Assoc.* 2009;235(5):540-3.
25. Peng H, Liu D, Ma Y, Gao W. Comparison of community- and healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates at a Chinese tertiary hospital, 2012–2017. *Sci Rep.* 2018;8(1):17916.
26. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Lancet.* 2010;375(9725):1557-68.
27. Popovich KJ, Hota B. Treatment and prevention of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin and soft tissue infections. *Dermatol Ther.* 2008;21(3):167-79.
28. Şanlı K, Mart Kömürcü SZ, Kansak N, Adaleti R. Change of Staphylococcus aureus' methicillin resistance and Antibigram resistance profile and frequency in 15 years (2004 And 2019). *Turk Mikrobiyol Cem Derg.* 2021;51(1):15-22.
29. Gould IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Lina G, et al. New insights into methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(2):96-104.
30. Humphreys H. 15 - Staphylococcus: Skin infections; osteomyelitis; bloodstream infection; food poisoning; foreign body infections; MRSA. Greenwood D, Barer M, Slack R, Irving W, editors. *Medical Microbiology (Eighteenth Edition)*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2012.

31. Stryjewski ME, Chambers HF. Skin and Soft-Tissue Infections Caused by Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008;46(Supplement_5):S368-S77.
32. Cohen PR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: a review of epidemiology, clinical features, management, and prevention. *Int J Dermatol*. 2007;46(1):1-11.
33. Antimicrobial resistance [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
34. O'Neill J, Resistance RoA, Trust W. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations: Review on Antimicrobial Resistance; 2016.
35. United Nations. UN, global health agencies sound alarm on drug-resistant infections; new recommendations to reduce 'staggering number' of future deaths [Internet]. 2019 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://news.un.org/en/story/2019/04/1037471>.
36. Menon GK. Skin basics; structure and function. Pappas A, editor. *Lipids and skin health*. Cham: Springer International Publishing; 2015.
37. Brown MB, Martin GP, Jones SA, Akomeah FK. Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Deliv*. 2006;13(3):175-87.
38. Bouwstra JA, Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res*. 2003;42(1):1-36.
39. Smith R, Russo J, Fiegel J, Brogden N. Antibiotic Delivery Strategies to Treat Skin Infections When Innate Antimicrobial Defense Fails. *Antibiotics*. 2020;9(2):56.
40. Benson HAE, Grice JE, Mohammed Y, Namjoshi S, Roberts MS. Topical and Transdermal Drug Delivery: From Simple Potions to Smart Technologies. *Curr Drug Deliv*. 2019;16(5):444-60.
41. Layers of the Skin [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/5-1-layers-of-the-skin>.
42. Roberts MS, Cross SE, Pellett MA. Skin transport. Walters KA, editor. *Dermatological and transdermal formulations*: CRC Press; 2002.
43. Juráňová J, Franková J, Ulrichová J. The role of keratinocytes in inflammation. *J Appl Biomed*. 2017;15(3):169-79.
44. Honari G. Skin structure and function. Honari G, Andersen R, Maibach HI, editors. *Sensitive skin syndrome*: CRC Press; 2017.
45. Kendall AC, Nicolaou A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. *Prog Lipid Res*. 2013;52(1):141-64.
46. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*. 2010;28(10):469-72.

47. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8).
48. Gorzelanny C, Mess C, Schneider SW, Huck V, Brandner JM. Skin Barriers in Dermal Drug Delivery: Which Barriers Have to Be Overcome and How Can We Measure Them? *Pharmaceutics.* 2020;12(7).
49. Tscheik C, Blasig IE, Winkler L. Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers.* 2013;1(2):e24565.
50. Zoabi A, Touitou E, Margulis K. Recent Advances in Nanomaterials for Dermal and Transdermal Applications. *Colloids and Interfaces.* 2021;5(1):18.
51. Scheuplein RJ, Blank IH. Permeability of the skin. *Physiol Rev.* 1971;51(4):702-47.
52. Jepps OG, Dancik Y, Anissimov YG, Roberts MS. Modeling the human skin barrier—Towards a better understanding of dermal absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(2):152-68.
53. Taylor KM, Aulton ME. *Aulton's Pharmaceutics E-Book: Elsevier Health Sciences;* 2021.
54. Shehata H. Chapter Twelve - Drugs and drug therapy. Bennett P, Williamson C, editors. *Basic Science in Obstetrics and Gynaecology (Fourth Edition): Churchill Livingstone;* 2010.
55. Brodeur J, Tardif R. Absorption. Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition).* New York: Elsevier; 2005.
56. Cooper G, Adams K. *The cell: a molecular approach: Oxford University Press;* 2022.
57. Pollock PJ, Schumacher J. Chapter 23 - Principles of wound management. Mair TS, Love S, Schumacher J, Smith RKW, Frazer G, editors. *Equine Medicine, Surgery and Reproduction (Second Edition).* Oxford: W.B. Saunders; 2012.
58. Yazarlu O, Iranshahi M, Kashani HRK, Reshadat S, Habtemariam S, et al. Perspective on the application of medicinal plants and natural products in wound healing: A mechanistic review. *Pharmacol Res.* 2021;174:105841.
59. Irfan-Maqsood M. Classification of wounds: know before research and clinical practice. *Journal of Genes and Cells.* 2018;4(1):1-4.
60. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.
61. Gonzalez ACdO, Costa TF, Andrade Zda, Medrado ARAP. Wound healing- A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016;91(5):614-20.
62. Hunt M, Torres M, Bachar-Wikström E, Wikström JD. Multifaceted roles of mitochondria in wound healing and chronic wound pathogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2023;11.
63. Broughton G, II, Janis JE, Attinger CE. *The Basic Science of Wound Healing. Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7S).

64. Margetic S. Inflammation and haemostasis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22(1):49-62.
65. Trengove NJ, Langton SR, Stacey MC. Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration*. 1996;4(2):234-9.
66. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111(5):383-9.
67. Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2011;29(10):475-9.
68. Robson MC. WOUND INFECTION: A Failure of Wound Healing Caused by an Imbalance of Bacteria. *Surgical Clinics of North America*. 1997;77(3):637-50.
69. Witte MB, Barbul A. General Principles of Wound Healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-28.
70. One Health [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>.
71. UNEP One Health [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://www.unep.org/topics/chemicals-and-pollution-action/pollution-and-health/unep-one-health>.
72. Antimicrobial resistance: a global threat [Internet]. 2024 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://www.unep.org/topics/chemicals-and-pollution-action/pollution-and-health/antimicrobial-resistance-global-threat>.
73. Murugaiyan J, Kumar PA, Rao GS, Iskandar K, Hawser S, ve ark. Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics*. 2022;11(2):200.
74. Pham TN, Loupias P, Dassonville-Klimpt A, Sonnet P. Drug delivery systems designed to overcome antimicrobial resistance. *Med Res Rev*. 2019;39(6):2343-96.
75. Aly R. Chapter 98 Microbial Infections of Skin and Nails. Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
76. Yew YW, Kuan AHY, Ge L, Yap CW, Heng BH. Psychosocial impact of skin diseases: A population-based study. *PLoS One*. 2020;15(12):e0244765.
77. Wang V, Boguniewicz J, Boguniewicz M, Ong PY. The infectious complications of atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2021;126(1):3-12.
78. Puar N, Nopper AJ. 67 - Superficial Bacterial Skin Infections and Cellulitis. Long SS, editor. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Sixth Edition)*. Philadelphia: Elsevier; 2023.
79. Mahmoud ERA, Ahmed HAH, Abo-senna ASM, Riad OKM, Abo- Shadi MMAAR. Isolation and characterization of six gamma-irradiated

- bacteriophages specific for MRSA and VRSA isolated from skin infections. *J Radiat Res Appl Sci.* 2021;14(1):34-43.
80. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, ve ark. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):18033.
 81. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, ve ark. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The lancet.* 1940;236(6104):226-8.
 82. Barber M. The incidence of penicillin-sensitive variant colonies in penicillinase-producing strains of *Staphylococcus pyogenes*. *Microbiology.* 1949;3(2):274-81.
 83. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev.* 1987;51(1):88-134.
 84. Loomba PS, Taneja J, Mishra B. Methicillin and Vancomycin Resistant *S. aureus* in Hospitalized Patients. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(3):275-83.
 85. Davey P, Sneddon J, Nathwani D. Overview of strategies for overcoming the challenge of antimicrobial resistance. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2010;3(5):667-86.
 86. Dibah S, Arzanlou M, Jannati E, Shapouri R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. *Iran J Microbiol.* 2014;6(3):163-8.
 87. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(6):1549-55.
 88. Siddiqui AH, Koirala J. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
 89. Pantosti A, Venditti M. What is MRSA? *Eur Respir J.* 2009;34(5):1190-6.
 90. Weese JS, Dick H, Willey BM, McGeer A, Kreiswirth BN, ve ark. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Vet Microbiol.* 2006;115(1):148-55.
 91. Ferreira JP, Anderson KL, Correa MT, Lyman R, Ruffin F, ve ark. Transmission of MRSA between companion animals and infected human patients presenting to outpatient medical care facilities. *PLoS One.* 2011;6(11):e26978.
 92. Silva V, Monteiro A, Pereira JE, Maltez L, Igrejas G, ve ark. MRSA in Humans, Pets and Livestock in Portugal: Where We Came from and Where We Are Going. *Pathogens.* 2022;11(10):1110.
 93. Roy MC, Chowdhury T, Hossain MT, Hasan MM, Zahran E, ve ark. Zoonotic linkage and environmental contamination of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy farms: A one health perspective. *One Health.* 2024;18:100680.

94. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2008;46(Supplement_5):S344-S9.
95. Lambert RJ, Hanlon GW, Denyer SP. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*. 2004;96(2):244-53.
96. Vuong C, Yeh AJ, Cheung GY, Otto M. Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016;25(1):73-93.
97. Stefani S, Bongiorno D, Mongelli G, Campanile F. Linezolid Resistance in *Staphylococci*. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010;3(7):1988-2006.
98. Sabat AJ, Tinelli M, Grundmann H, Akkerboom V, Monaco M, ve ark. Daptomycin Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Strain With Novel Non-synonymous Mutations in the *mprF* and *vraS* Genes: A New Insight Into Daptomycin Resistance. *Front Microbiol*. 2018;9:2705.
99. Long SW, Olsen RJ, Mehta SC, Palzkill T, Cernoch PL, ve ark. PBP2a mutations causing high-level ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(11):6668-74.
100. Varshney AK, Wang X, MacIntyre J, Zollner RS, Kelleher K, ve ark. Humanized staphylococcal enterotoxin B (SEB)-specific monoclonal antibodies protect from SEB intoxication and *Staphylococcus aureus* infections alone or as adjunctive therapy with vancomycin. *J Infect Dis*. 2014;210(6):973-81.
101. Schuch R, Lee HM, Schneider BC, Sauve KL, Law C, ve ark. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia. *J Infect Dis*. 2014;209(9):1469-78.
102. Paul VD, Rajagopalan SS, Sundarrajan S, George SE, Asrani JY, ve ark. A novel bacteriophage Tail-Associated Muralytic Enzyme (TAME) from Phage K and its development into a potent antistaphylococcal protein. *BMC microbiology*. 2011;11:1-11.
103. Novick RP, Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. *Annual review of genetics*. 2008;42(1):541-64.
104. Nainu F, Permana AD, Djide NJN, Anjani QK, Utami RN, ve ark. Pharmaceutical Approaches on Antimicrobial Resistance: Prospects and Challenges. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(8).
105. Coates ARM, Hu Y, Holt J, Yeh P. Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: synergy, rejuvenation and resistance reduction. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18(1):5-15.
106. Yi H, Yuan G, Li S, Xu X, Guan Y, ve ark. Drug Combinations to Prevent Antimicrobial Resistance: Various Correlations and Laws, and Their Verifications, Thus Proposing Some Principles and a Preliminary Scheme. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(10).

107. Singh I, Kumar S, Singh S, Wani MY. Overcoming resistance: Chitosan-modified liposomes as targeted drug carriers in the fight against multidrug resistant bacteria-a review. *Int J Biol Macromol*. 2024;278:135022.
108. Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*. 2011;156(2):128-45.
109. Singh I, Kumar S. Liposomes as Efficient Drug Delivery Vehicles to Combat Antimicrobial Resistance. Wani MY, Wani IA, Rai A, editors. *Nanotechnology Based Strategies for Combating Antimicrobial Resistance*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2024.
110. Hetta HF, Ramadan YN, Al-Harbi AI, E AA, Battah B, ve ark. Nanotechnology as a Promising Approach to Combat Multidrug Resistant Bacteria: A Comprehensive Review and Future Perspectives. *Biomedicines*. 2023;11(2).
111. Lundberg CV, Frimodt-Møller N. Efficacy of topical and systemic antibiotic treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine superficial skin wound infection model. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(3):272-5.
112. Brown NM, Goodman AL, Horner C, Jenkins A, Brown EM. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK. *JAC-Antimicrobial Resistance*. 2021;3(1).
113. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, ve ark. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clin Infect Dis*. 2011;52(3):e18-e55.
114. Gould FK, Brindle R, Chadwick PR, Fraise AP, Hill S, ve ark. Guidelines (2008) for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(5):849-61.
115. O'Meara S, Cullum N, Majid M, Sheldon T. Systematic reviews of wound care management:(3) antimicrobial agents for chronic wounds;(4) diabetic foot ulceration. *Health Technol Assess*. 2000;4(21):1-237.
116. Martínez-Aguilar G, Hammerman WA, Mason EO, Jr., Kaplan SL. Clindamycin treatment of invasive infections caused by community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(7):593-8.
117. Yoon YK, Kim ES, Hur J, Lee S, Kim SW, ve ark. Oral Antimicrobial Therapy: Efficacy and Safety for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections and Its Impact on the Length of Hospital Stay. *Infect Chemother*. 2014;46(3):172-81.
118. Iyer S, Jones DH. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infection: a retrospective analysis of clinical presentation and treatment of a local outbreak. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50(6):854-8.
119. Frei CR, Miller ML, Lewis JS, 2nd, Lawson KA, Hunter JM, ve ark. Trimethoprim-sulfamethoxazole or clindamycin for community-associated

- MRSA (CA-MRSA) skin infections. *J Am Board Fam Med.* 2010;23(6):714-9.
120. Cohen PR, Grossman ME. Management of cutaneous lesions associated with an emerging epidemic: community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(1):132-5.
 121. Cohen PR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: implications for patients and practitioners. *Am J Clin Dermatol.* 2007;8(5):259-70.
 122. Cunha BA. Minocycline, often forgotten but preferred to trimethoprim-sulfamethoxazole or doxycycline for the treatment of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(6):497-9.
 123. Kotsaki A, Tziolos N, Kontopoulou T, Koutelidakis IM, Symbardi S, ve ark. Oral minocycline plus rifampicin versus oral linezolid for complicated skin and skin structure infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The AIDA open label, randomized, controlled Phase 4 trial. *EClinicalMedicine.* 2023;56:101790.
 124. Bishburg E, Bishburg K. Minocycline—an old drug for a new century: emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(5):395-401.
 125. Weigelt J, Itani K, Stevens D, Lau W, Dryden M, ve ark. Linezolid versus vancomycin in treatment of complicated skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2260-6.
 126. Watkins RR, Lemonovich TL, File TM, Jr. An evidence-based review of linezolid for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): place in therapy. *Core Evid.* 2012;7:131-43.
 127. Itani KMF, Biswas P, Reisman A, Bhattacharyya H, Baruch AM. Clinical Efficacy of Oral Linezolid Compared With Intravenous Vancomycin for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*—Complicated Skin and Soft Tissue Infections: A Retrospective, Propensity Score–Matched, Case-Control Analysis. *Clin Ther.* 2012;34(8):1667-73.e1.
 128. Sorrel TC, Packham DR, Shanker S, Foldes M, Munro R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Internal Medicine.* 1982;97(3):344-50.
 129. Frank AL, Marcinak JF, Mangat PD, Tjhio JT, Kelkar S, ve ark. Clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21(6):530-4.
 130. Kaur R, Gautam V, Ray P, Singh G, Singhal L, ve ark. Daptomycin susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Indian J Med Res.* 2012;136(4):676-7.
 131. Heidary M, Khosravi AD, Khoshnood S, Nasiri MJ, Soleimani S, ve ark. Daptomycin. *J Antimicrob Chemother.* 2017;73(1):1-11.

132. Drew RH, Perfect JR, Srinath L, Kurkimilis E, Dowzicky M, ve ark. Treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus infections with quinupristin-dalfopristin in patients intolerant of or failing prior therapy. For the Synercid Emergency-Use Study Group. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(5):775-84.
133. Ellis-Grosse EJ, Babinchak T, Dartois N, Rose G, Loh E. The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of skin and skin-structure infections: results of 2 double-blind phase 3 comparison studies with vancomycin-aztreonam. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 5:S341-53.
134. Zhao L, Chen J, Bai B, Song G, Zhang J, ve ark. Topical drug delivery strategies for enhancing drug effectiveness by skin barriers, drug delivery systems and individualized dosing. *Front Pharmacol.* 2023;14:1333986.
135. Raina N, Rani R, Thakur VK, Gupta M. New Insights in Topical Drug Delivery for Skin Disorders: From a Nanotechnological Perspective. *ACS Omega.* 2023;8(22):19145-67.
136. Golan Y. Current Treatment Options for Acute Skin and Skin-structure Infections. *Clin Infect Dis.* 2019;68(Suppl 3):S206-s12.
137. Laube S. Skin infections and ageing. *Ageing Res Rev.* 2004;3(1):69-89.
138. Hillier A, Foster AP, Kwochka K. *Advances in Veterinary Dermatology Volume 5: Wiley-Blackwell; 2005.*
139. Maddison JE, Page SW, Church DB. *Small animal clinical pharmacology: Elsevier Health Sciences; 2008.*
140. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. *Muller and Kirk's small animal dermatology: Elsevier Health Sciences; 2012.*
141. Parsa M, Trybala A, Malik DJ, Starov V. Foam in pharmaceutical and medical applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2019;44:153-67.
142. Chang R-K, Raw A, Lionberger R, Yu L. Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. *The AAPS Journal.* 2013;15(1):41-52.
143. Forbes MA, Cook HG. Neomycin lotion in treatment of cutaneous bacterial infections. *AMA Archives of Dermatology and Syphilology.* 1953;68(6):631-4.
144. Kyle AA, Dahl MV. Topical therapy for fungal infections. *Am J Clin Dermatol.* 2004;5:443-51.
145. Teng Y, Li S, Tang H, Tao X, Fan Y, ve ark. Medical Applications of Hydrogels in Skin Infections: A Review. *Infect Drug Resist.* 2023;16:391-401.
146. Mohiuddin AK. Skin care creams: formulation and use. *Dermatol Clin Res.* 2019;5(1):238-71.
147. Chauhan L, Gupta S. Creams: a review on classification, preparation methods, evaluation and its applications. *J Drug Deliv Ther.* 2020;10(5-s):281-9.

148. Gilbert M. Topical 2% mupirocin versus 2% fusidic acid ointment in the treatment of primary and secondary skin infections. *J Am Acad Dermatol.* 1989;20(6):1083-7.
149. Whitby M. Fusidic acid in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 1999;12:S67-S71.
150. Spelman D. Fusidic acid in skin and soft tissue infections. *Int J Antimicrob Agents.* 1999;12:S59-S66.
151. Wilkinson JD. Fusidic acid in dermatology. *Br J Dermatol.* 1998;139 Suppl 53:37-40.
152. Heng YK, Tan KT, Sen P, Chow A, Leo YS, ve ark. *Staphylococcus aureus* and topical fusidic acid use: results of a clinical audit on antimicrobial resistance. *Int J Dermatol.* 2013;52(7):876-81.
153. Long BH. 2. Fusidic acid in skin and soft-tissue infections. *Acta Dermato-Venereologica.* 2008.
154. Gisby J, Bryant J. Efficacy of a new cream formulation of mupirocin: comparison with oral and topical agents in experimental skin infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(2):255-60.
155. Rode H, Hanslo D, de Wet PM, Millar AJ, Cywes S. Efficacy of mupirocin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* burn wound infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(8):1358-61.
156. van Rijen M, Bonten M, Wenzel R, Kluytmans J. Mupirocin ointment for preventing *Staphylococcus aureus* infections in nasal carriers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(4):CD006216.
157. Strock LL, Lee MM, Rutan RL, Desai MH, Robson MC, ve ark. Topical Bactroban (mupirocin): efficacy in treating burn wounds infected with methicillin-resistant staphylococci. *J Burn Care Rehabil.* 1990;11(5):454-9.
158. Rumsfield J, West DP, Aronson IK. Topical mupirocin in the treatment of bacterial skin infections. *Drug Intell Clin Pharm.* 1986;20(12):943-8.
159. Hafdani FN, Sadeghinia N. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. *Int J Pharm Sci.* 2011;5(2):46-50.
160. Tanus T, Scangarella-Oman NE, Dalessandro M, Li G, Breton JJ, ve ark. A randomized, double-blind, comparative study to assess the safety and efficacy of topical retapamulin ointment 1% versus oral linezolid in the treatment of secondarily infected traumatic lesions and impetigo due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Adv Skin Wound Care.* 2014;27(12):548-59.
161. Koning S, van der Wouden JC, Chosidow O, Twynholm M, Singh KP, ve ark. Efficacy and safety of retapamulin ointment as treatment of impetigo: randomized double-blind multicentre placebo-controlled trial. *Br J Dermatol.* 2008;158(5):1077-82.
162. Oranje AP, Chosidow O, Sacchidanand S, Todd G, Singh K, ve ark. Topical retapamulin ointment, 1%, versus sodium fusidate ointment, 2%, for impetigo:

- a randomized, observer-blinded, noninferiority study. *Dermatology*. 2007;215(4):331-40.
163. Ray P, Singh S, Gupta S. Topical Antimicrobial Therapy: Current Status and Challenges. *Indian J Med Microbiol*. 2019;37(3):299-308.
 164. Odum BC, O'Keefe JS, Lara W, Rodeheaver GT, Edlich RF. Influence of absorbable dusting powders on wound infection. *J Emerg Med*. 1998;16(6):875-9.
 165. Mariappan R, Manninen P, Massicotte EM, Bhatia A. Circulatory collapse after topical application of vancomycin powder during spine surgery. *J Neurosurg Spine*. 2013;19(3):381-3.
 166. Liu H, Cai Y, Chu Y, Yu X, Song F, ve ark. Formulation of chrysoomycin A cream for the treatment of skin infections. *Molecules*. 2022;27(14):4613.
 167. Franklin A, Calver R. Fusidic acid gel in the treatment of abscesses. *The Practitioner*. 1974;212(1269):388-90.
 168. Courtney SP, Merlin M. The use of fusidic acid gel in pilonidal abscess treatment: cure, recurrence and failure rates. *Ann R Coll Surg Engl*. 1986;68(3):170.
 169. Sehgal VN, Prasad PV, Kaviarasan PK, Rajan D. Trophic skin ulceration in leprosy: evaluation of the efficacy of topical phenytoin sodium zinc oxide paste. *Int J Dermatol*. 2014;53(7):873-8.
 170. Kotwiski FO, Albuquerque E, Lucchese AM. Topical foam as a promising carrier system for active pharmaceutical ingredients: review of clinical studies. *Pharm Dev Technol*. 2023;28(8):768-84.
 171. Tamarkin D. Foam: a unique delivery vehicle for topically applied formulations. *Handbook of formulating dermal applications: a definitive practical guide*. 2016:233-60.
 172. Ter Horst B, Moakes R, Chouhan G, Williams R, Moiemmen N, ve ark. A gellan-based fluid gel carrier to enhance topical spray delivery. *Acta Biomaterialia*. 2019;89:166-79.
 173. Weiss SC. Conventional topical delivery systems. *Dermatol Ther*. 2011;24(5):471-6.
 174. Ricciatti-Sibbald D, Sibbald RG. Dermatologic vehicles. *Clin Dermatol*. 1989;7(3):11-24.
 175. Mueller RS, Bergvall K, Bensignor E, Bond R. A review of topical therapy for skin infections with bacteria and yeast. *Vet Dermatol*. 2012;23(4):330-41, e62.
 176. Patil P, Datir S, Saudagar R. A review on topical gels as drug delivery system. *J Drug Deliv Ther*. 2019;9(3-s):989-94.
 177. un Nabi SAA, Sheraz MA, Ahmed S, Mustaan N, Ahmad I. Pharmaceutical gels: a review. *RADS J Pharm Pharm Sci*. 2016;4(1):40-8.

178. Ahmadi F, Oveisi Z, Samani SM, Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci.* 2015;10(1):1-16.
179. Verma A, Singh, Kaur R, Jain U. Topical gels as drug delivery systems: A review. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2013;23:374-82.
180. Bagmar NA, Hatwar PR, Shelke PG, Bakal RL. A review on" Topical gels: an emerging drug delivery system". *GSC Biol Pharm Sci.* 2024;28(2):285-96.
181. Kulawik-Pióro A, Miastkowska M. Polymeric gels and their application in the treatment of psoriasis vulgaris: A review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(10):5124.
182. Godge GR, Bharat S, Shaikh A, Randhawan B, Raskar M, ve ark. Formulation Perspectives in Topical Antifungal Drug Therapy: A Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics.* 2023;13(5):110-9.
183. Jindal S, Awasthi R, Singhare D, Kulkarni GT. Topical delivery of Tacrolimus using liposome containing gel: An emerging and synergistic approach in management of psoriasis. *Med Hypotheses.* 2020;142:109838.
184. Lei L, Bai Y, Qin X, Liu J, Huang W, ve ark. Current Understanding of Hydrogel for Drug Release and Tissue Engineering. *Gels.* 2022;8(5).
185. Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv.* 2016;23(2):564-78.
186. Sadeghi AMM, Dorkoosh FA, Avadi MR, Weinhold M, Bayat A, ve ark. Permeation enhancer effect of chitosan and chitosan derivatives: comparison of formulations as soluble polymers and nanoparticulate systems on insulin absorption in Caco-2 cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70(1):270-8.
187. Kirkland CR, Yelverton CB, Fleischer AB, Jr., Camacho FT, Feldman SR. Gel vehicles are not inherently more irritating than creams. *J Drugs Dermatol.* 2006;5(3):269-72.
188. Kaur L, Jain SK, Singh K. Vitamin E TPGS based nanogel for the skin targeting of high molecular weight anti-fungal drug: development and in vitro and in vivo assessment. *RSC advances.* 2015;5(66):53671-86.
189. Fardous J, Yamamoto E, Omoso Y, Nagao S, Inoue Y, ve ark. Development of a gel-in-oil emulsion as a transdermal drug delivery system for successful delivery of growth factors. *J Biosci Bioeng.* 2021;132(1):95-101.
190. Nicolson ATA, Gould IM. 7.18 - Fusidic Acid. Kenakin T, editor. *Comprehensive Pharmacology.* Oxford: Elsevier; 2022.
191. Fernandes P. Fusidic Acid: A Bacterial Elongation Factor Inhibitor for the Oral Treatment of Acute and Chronic Staphylococcal Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(1):a025437.
192. Schöfer H, Simonsen L. Fusidic acid in dermatology: an updated review. *Eur J Dermatol.* 2010;20(1):6-15.
193. Buechler CR, Daveluy SD. 15 - Topical Therapeutics. Shi VY, Hsiao JL, Lowes MA, Hamzavi IH, editors. *A Comprehensive Guide to Hidradenitis Suppurativa.* Philadelphia: Elsevier; 2022.

194. Turnidge J. Fusidic acid pharmacology, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;12 Suppl 2:S23-34.
195. Trubiano J, Grayson ML. 24 - Fusidic Acid. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2015.
196. Greenwood D. CHAPTER 19 - Fusidanes. Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ, editors. *Antibiotic and Chemotherapy (Ninth Edition)*. London: W.B. Saunders; 2010.
197. Godtfredsen WO, Jahnsen S, Lorck H, Roholt K, Tybring L. Fusidic acid: a new antibiotic. *Nature*. 1962;193:987.
198. Johns WH, Bates TR. Drug-Cholestyramine Interactions I: Physicochemical Factors Affecting In Vitro Binding of Sodium Fusidate to Cholestyramine. *J Pharm Sci*. 1972;61(5):730-5.
199. Reeves D. The pharmacokinetics of fusidic acid. *J Antimicrob Chemother*. 1987;20(4):467-76.
200. Hajikhani B, Goudarzi M, Kakavandi S, Amini S, Zamani S, ve ark. The global prevalence of fusidic acid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021;10(1):75.
201. Sahm D, Deane J, Pillar C, Fernandes P. In vitro activity of CEM-102 (fusidic acid) against prevalent clones and resistant phenotypes of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(9):4535-6.
202. Nathwani D, Davey PG, Marwick CA. MRSA: treating people with infection. *BMJ Clin Evid*. 2010;2010.
203. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG, Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(3):649-59.
204. Türkmen E, Şenel S. Fajların Antimikrobiyal Tedavide Kullanımı. *J Lit Pharm Sci*. 2020;9(3):271-84.
205. Abdelrahman F, Easwaran M, Daramola OI, Ragab S, Lynch S, ve ark. Phage-encoded endolysins. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(2):124.
206. Gondil VS, Harjai K, Chhibber S. Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55(2):105844.
207. São-José C. Engineering of Phage-Derived Lytic Enzymes: Improving Their Potential as Antimicrobials. *Antibiotics*. 2018;7(2):29.
208. Schmelcher M, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins — extending their application to tissues and the bloodstream. *Curr Opin Biotechnol*. 2021;68:51-9.
209. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev*. 1992;56(3):430-81.

210. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012;7(10):1147-71.
211. Belete MA, Tadesse S, Tilahun M, Alemayehu E, Saravanan M. Phage endolysins as new therapeutic options for multidrug resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging antibiotic-free way to combat drug resistant infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024;14.
212. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses.* 2021;13(4).
213. Kashani HH, Schmelcher M, Sabzalipoor H, Hosseini ES, Moniri R. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(1):10.1128/cmr.00071-17.
214. Rahman Mu, Wang W, Sun Q, Shah JA, Li C, et al. Endolysin, a Promising Solution against Antimicrobial Resistance. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(11):1277.
215. Kim S, Jin J-S, Choi Y-J, Kim J. LysSAP26, a new recombinant phage endolysin with a broad spectrum antibacterial activity. *Viruses.* 2020;12(11):1340.
216. Loessner MJ. Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol.* 2005;8(4):480-7.
217. Portilla S, Fernández L, Gutiérrez D, Rodríguez A, García P. Encapsulation of the Antistaphylococcal Endolysin LysRODI in pH-Sensitive Liposomes. *Antibiotics.* 2020;9(5):242.
218. Bai J, Yang E, Chang P-S, Ryu S. Preparation and characterization of endolysin-containing liposomes and evaluation of their antimicrobial activities against gram-negative bacteria. *Enzyme Microb Technol.* 2019;128:40-8.
219. Hathaway H, Ajuebor J, Stephens L, Coffey A, Potter U, et al. Thermally triggered release of the bacteriophage endolysin CHAP(K) and the bacteriocin lysostaphin for the control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Control Release.* 2017;245:108-15.
220. Singla S, Harjai K, Katare OP, Chhibber S. Bacteriophage-Loaded Nanostructured Lipid Carrier: Improved Pharmacokinetics Mediates Effective Resolution of *Klebsiella pneumoniae*-Induced Lobar Pneumonia. *J Infect Dis.* 2015;212(2):325-34.
221. Singla S, Harjai K, Katare OP, Chhibber S. Encapsulation of Bacteriophage in Liposome Accentuates Its Entry in to Macrophage and Shields It from Neutralizing Antibodies. *PLOS ONE.* 2016;11(4):e0153777.
222. Gondil VS, Chhibber S. Bacteriophage and endolysin encapsulation systems: a promising strategy to improve therapeutic outcomes. *Front Pharmacol.* 2021;12:675440.
223. Khan FM, Chen JH, Zhang R, Liu B. A comprehensive review of the applications of bacteriophage-derived endolysins for foodborne bacterial

- pathogens and food safety: recent advances, challenges, and future perspective. *Front Microbiol.* 2023;14:1259210.
224. Furfaro LL, Payne MS, Chang BJ. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8.
 225. Parracho HM, Burrowes BH, Enright MC, McConville ML, Harper DR. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *J Mol Genet Med.* 2012;6:279-86.
 226. Speck P, Smithyman A. Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. *FEMS Microbiol Lett.* 2016;363(3).
 227. Khan FM, Rasheed F, Yang Y, Liu B, Zhang R. Endolysins: a new antimicrobial agent against antimicrobial resistance. Strategies and opportunities in overcoming the challenges of endolysins against Gram-negative bacteria. *Front Pharmacol.* 2024;15.
 228. Abdurahman MA. Recombinant phage endolysins production and investigation of their efficacy against staphylococcal biofilms [PhD thesis]. Trabzon: Karadeniz Technical University; 2018.
 229. Şenel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(10):1467-80.
 230. Şenel S. Current status and future of chitosan in drug and vaccine delivery. *React Funct Polym.* 2020;147:104452.
 231. Confederat LG, Tuchilus CG, Dragan M, Sha'at M, Dragostin OM. Preparation and Antimicrobial Activity of Chitosan and Its Derivatives: A Concise Review. *Molecules.* 2021;26(12):3694.
 232. Detsi A, Kavetsou E, Kostopoulou I, Pitterou I, Pontillo ARN, ve ark. Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix. *Pharmaceutics.* 2020;12(7).
 233. Naskar S, Koutsu K, Sharma S. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. *J Drug Target.* 2019;27(4):379-93.
 234. Rajendran NK, Kumar SSD, Houreld NN, Abrahamse H. A review on nanoparticle based treatment for wound healing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2018;44:421-30.
 235. Mohammed MA, Syeda JTM, Wasan KM, Wasan EK. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2017;9(4).
 236. Rajitha P, Gopinath D, Biswas R, Sabitha M, Jayakumar R. Chitosan nanoparticles in drug therapy of infectious and inflammatory diseases. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016;13(8):1177-94.
 237. Zhang K, Li J, Wang Y, Mu Y, Sun X, ve ark. Hydroxybutyl chitosan/diatom-biosilica composite sponge for hemorrhage control. *Carbohydr Polym.* 2020;236:116051.

238. He Y, Zhao W, Dong Z, Ji Y, Li M, ve ark. A biodegradable antibacterial alginate/carboxymethyl chitosan/Kangfuxin sponges for promoting blood coagulation and full-thickness wound healing. *Int J Biol Macromol.* 2021;167:182-92.
239. Xia Y, Wang D, Liu D, Su J, Jin Y, ve ark. Applications of Chitosan and its Derivatives in Skin and Soft Tissue Diseases. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:894667.
240. Chung Y-C, Chen C-Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource technology.* 2008;99(8):2806-14.
241. Másson M, Holappa J, Hjálmarsson M, Rúnarsson Ö, Nevalainen T, ve ark. Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan. *Carbohydr Polym.* 2008;74:566-71.
242. Goy RC, Morais STB, Assis OBG. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Rev Bras Farmacogn.* 2016;26(1):122-7.
243. Hosseinnejad M, Jafari SM. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *Int J Biol Macromol.* 2016;85:467-75.
244. Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microb Biotechnol.* 2009;2(2):186-201.
245. Ke C-L, Deng F-S, Chuang C-Y, Lin C-H. Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. *Polymers.* 2021;13(6):904.
246. Rohde M. The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiol Spectr.* 2019;7(3):10.1128/microbiolspec. gpp3-0044-2018.
247. Raafat D, Barga K, Haas A, Sahl H-G. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(12):3764-73.
248. Mishra AK, Rawat M, Viswas KN, Abhishek, Kumar S, ve ark. Expression and lytic efficacy assessment of the *Staphylococcus aureus* phage SA4 lysin gene. *J Vet Sci.* 2013;14(1):37-43.
249. Cé R, Pacheco BZ, Ciocheta TM, Barbosa FS, Alves AdCS, ve ark. Antibacterial activity against Gram-positive bacteria using fusidic acid-loaded lipid-core nanocapsules. *React Funct Polym.* 2021;162:104876.
250. Omolo CA, Kalhapure RS, Agrawal N, Rambharose S, Mocktar C, ve ark. Formulation and Molecular Dynamics Simulations of a Fusidic Acid Nanosuspension for Simultaneously Enhancing Solubility and Antibacterial Activity. *Mol Pharmaceutics.* 2018;15(8):3512-26.
251. Hassib ST, Mahrouse MA, Elkady EF, Sayed RM. Simultaneous HPLC Determination of Betamethasone Esters-Containing Mixtures: Analysis of Their Topical Preparations. *Journal of chromatographic science.* 2018;56(8):716-23.

252. Curbete MM, Salgado HRN. A Critical Review of the Properties of Fusidic Acid and Analytical Methods for Its Determination. *Crit Rev Anal Chem.* 2016;46(4):352-60.
253. Curbete MM, Salgado HRN. Stability-indicating RP-LC method for quantification of fusidic acid in cream. *Braz J Pharm Sci.* 2016;52(03):447-57.
254. ICH: Q 2 (R1): Validation of analytical procedures: Text and methodology [Internet]. 1995 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures>.
255. Lee G, Choi M, Truong K, Mai X-L, Kang J-S, ve ark. Development of HPLC assay method of fusidate sodium tablets. *Anal Sci Technol.* 2017:154-8.
256. Qubit™ Protein Assay Kits [Internet]. 2022 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FQubit_Protein_Assay_UG.pdf.
257. Ball AP, Gray JA, Murdoch JM. Fusidic Acid (Sodium Fusidate). Ball AP, Gray JA, Murdoch JM, editors. *Antibacterial Drugs Today*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1978.
258. Fusidic acid [Internet]. 2005 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://go.drugbank.com/drugs/DB02703>.
259. PubChem Compound Summary for CID 3000226, Fusidic acid [Internet]. 2022 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fusidic-acid>.
260. Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, Association AP, editors. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th ed. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2009.
261. TİTCK. Fucidin %2 Krem [Internet]. [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: https://titck.gov.tr/storage/Archive/2023/kubKtAttachments/ONAYLIKBR_84c41fea-20d6-41ad-b8a6-9aafb5ed9edb.pdf.
262. TİTCK. Fucidin %2 Merhem [Internet]. [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: https://titck.gov.tr/storage/Archive/2019/kubKtAttachments/1311-kub-temiz.pdf_fa46b6aa-a49b-4a76-82fe-09d6f9bdef9c.pdf.
263. Türkmen E, Parmaksız S, Nigiz Ş, Sağıroğlu M, Şenel S. A safe bioadhesive system for topical delivery of combined antimicrobials in treatment of skin infections in veterinary medicine. *J Drug Deliv Technol.* 2023;80:104116.
264. Blisse M, Idelevich EA, Becker K. Investigation of In-Vitro Adaptation toward Sodium Bituminosulfonate in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms.* 2020;8(12):1962.
265. Tseng CW, Sanchez-Martinez M, Arruda A, Liu GY. Subcutaneous infection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Vis Exp.* 2011(48):2528.

266. Malachowa N, Kobayashi S, Braughton K, Deleo F. Mouse Model of Staphylococcus aureus Skin Infection. *Methods Mol Biol.* 2013;1031:109-16.
267. Mohammad H, Cushman M, Seleem MN. Antibacterial Evaluation of Synthetic Thiazole Compounds In Vitro and In Vivo in a Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Skin Infection Mouse Model. *PLOS ONE.* 2015;10(11):e0142321.
268. Abramov Y, Golden B, Sullivan M, Botros SM, Miller JJ, ve ark. Histologic characterization of vaginal vs. abdominal surgical wound healing in a rabbit model. *Wound Repair Regen.* 2007;15(1):80-6.
269. Hasmann A, Wehrschütz-Sigl E, Marold A, Wiesbauer H, Schoeftner R, ve ark. Analysis of myeloperoxidase activity in wound fluids as a marker of infection. *Annals of clinical biochemistry.* 2013;50(3):245-54.
270. Krishna S, Miller LS. Innate and adaptive immune responses against Staphylococcus aureus skin infections. *Semin Immunopathol.* 2012;34(2):261-80.
271. Miller LS, Cho JS. Immunity against Staphylococcus aureus cutaneous infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):505-18.
272. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585-601.
273. Cyto-Fast™ Fix/Perm Buffer Set [Internet]. 2018 [Erişim tarihi 4 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://www.biolegend.com/fr-ch/products/cyto-fast-fix-perm-buffer-set-16765>.
274. O'Neill M, McPartlin J, Arthure K, Riedel S, McMillan N. Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *J Phys Conf Ser.* 2011;307:012047.
275. Bradley J. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology.* 2008;214(2):149-60.
276. Hong HW, Kim YD, Jang J, Kim MS, Song M, ve ark. Combination Effect of Engineered Endolysin EC340 With Antibiotics. *Front Microbiol.* 2022;13:821936.
277. Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Effects of Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) in Epidermal Keratinocytes Revealed Using Global Transcriptional Profiling*. *J Biol Chem.* 2004;279(31):32633-42.
278. Ashcroft GS, Jeong MJ, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, ve ark. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2012;20(1):38-49.
279. Ritsu M, Kawakami K, Kanno E, Tanno H, Ishii K, ve ark. Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery.* 2017;21(1):14-9.

280. Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. *Adv Wound Care*. 2018;7(7):209-31.
281. Ridder MJ, McReynolds AKG, Dai H, Pritchard MT, Markiewicz MA, ve ark. Kinetic Characterization of the Immune Response to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Subcutaneous Skin Infection. *Infect Immun*. 2022;90(7):e0006522.
282. Loeffler A, Baines SJ, Toleman MS, Felmingham D, Milsom SK, ve ark. In vitro activity of fusidic acid and mupirocin against coagulase-positive staphylococci from pets. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(6):1301-4.
283. Jyoti K, Malik G, Chaudhary M, Sharma M, Goswami M, ve ark. Chitosan and phospholipid assisted topical fusidic acid drug delivery in burn wound: Strategies to conquer pharmaceutical and clinical challenges, opportunities and future panorama. *Int J Biol Macromol*. 2020;161:325-35.
284. Ullah N, Khan D, Ahmed N, Zafar A, Shah KU, ve ark. Lipase-sensitive fusidic acid polymeric nanoparticles based hydrogel for on-demand delivery against MRSA-infected burn wounds. *J Drug Deliv Technol*. 2023;80:104110.
285. Okur ME, Ayla Ş, Yozgatlı V, Aksu NB, Yoltaş A, ve ark. Evaluation of burn wound healing activity of novel fusidic acid loaded microemulsion based gel in male Wistar albino rats. *Saudi Pharm J*. 2020;28(3):338-48.
286. Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin Infect Dis*. 2009;49(10):1541-9.
287. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci*. 2006;28(5):359-70.
288. Schmid-Wendtner MH, Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006;19(6):296-302.
289. Jin Q, Kirk MF. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Front Environ Sci*. 2018;6.
290. Proksch E. pH in nature, humans and skin. *J Dermatol*. 2018;45(9):1044-52.
291. Krajewska B, Wydro P, Jańczyk A. Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films. *Biomacromolecules*. 2011;12(11):4144-52.
292. Ding L, Huang Y, Cai X, Wang S. Impact of pH, ionic strength and chitosan charge density on chitosan/casein complexation and phase behavior. *Carbohydr Polym*. 2018;208.
293. Maciejewska B, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(6):2563-81.

294. Laffleur F, Bernkop-Schnürch A. Evaluation of dermal adhesive formulations for topical application. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;124:89-94.
295. Nilsen-Nygaard J, Strand SP, Vårum KM, Draget KI, Nordgård CT. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers.* 2015;7(3):552-79.
296. Kumar K, Dhawan N, Sharma H, Vaidya S, Vaidya B. Bioadhesive polymers: Novel tool for drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2014;42(4):274-83.
297. Carvalho FC, Calixto G, Hatakeyama IN, Luz GM, Gremião MP, ve ark. Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2013;39(11):1750-7.
298. Eid AM, Istateyeh I, Salhi N, Istateyeh T. Antibacterial Activity of Fusidic Acid and Sodium Fusidate Nanoparticles Incorporated in Pine Oil Nanoemulgel. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:9411-21.
299. Eleraky N, Fetih G, El-Badry M. PERFORMANCE OF QUERCETIN-CHITOSAN GELS AS TOPICAL DELIVERY SYSTEMS. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut.* 2019;42:71-9.
300. Prajapati B. Crosslinked chitosan gel for local drug delivery of clotrimazole. *J Sci Tec.* 2010:43-52.
301. Peers S, Montembault A, Ladavière C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. *J Control Release.* 2020;326:150-63.
302. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(1):83-99.
303. Sahariah P, Másson M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship. *Biomacromolecules.* 2017;18(11):3846-68.
304. Goy RC, Britto Dd, Assis OB. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros.* 2009;19:241-7.
305. Li J, Zhuang S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *European Polymer Journal.* 2020;138:109984.
306. Verlee A, Mincke S, Stevens CV. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym.* 2017;164:268-83.
307. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Shafi ME, Zabermawi NM, Arif M, ve ark. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:2726-44.
308. Ma Z, Garrido-Maestu A, Jeong KC. Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydr Polym.* 2017;176:257-65.
309. Zheng L-Y, Zhu J-F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers.* 2003;54(4):527-30.

310. Ardean C, Davidescu CM, Nemeş NS, Negrea A, Ciopec M, ve ark. Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14).
311. Akca G, Özdemir A, Öner Z, Senel S. Comparison of different types and sources of chitosan for the treatment of infections in the oral cavity. *Res Chem Intermediat.* 2018;44.
312. Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair SV, Tamura H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydr Polym.* 2010;82(2):227-32.
313. Jou C-H. Antibacterial activity and cytocompatibility of chitosan-N-hydroxy-2, 3-propyl-N methyl-N, N-diallylammonium methyl sulfate. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;88(1):448-54.
314. Rathinam S, Ólafsdóttir S, Jónsdóttir S, Hjálmarsdóttir MÁ, Másson M. Selective synthesis of N, N, N-trimethylated chitosan derivatives at different degree of substitution and investigation of structure-activity relationship for activity against *P. aeruginosa* and MRSA. *Int J Biol Macromol.* 2020;160:548-57.
315. Jiang L, Wang F, Han F, Prinyawiwatkul W, No H, ve ark. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of water-soluble chitosan derivatives. *J Appl Microbiol.* 2013;114(4):956-63.
316. Mousavi SA, Ghotaslou R, Kordi S, Khoramdel A, Aeenfar A, ve ark. Antibacterial and antifungal effects of chitosan nanoparticles on tissue conditioners of complete dentures. *Int J Biol Macromol.* 2018;118:881-5.
317. Tikhonov VE, Stepnova EA, Babak VG, Yamskov IA, Palma-Guerrero J, ve ark. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. *Carbohydr Polym.* 2006;64(1):66-72.
318. Liu N, Chen X-G, Park H-J, Liu C-G, Liu C-S, ve ark. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydr Polym.* 2006;64(1):60-5.
319. Jones RN, Castanheira M, Rhomberg PR, Woosley LN, Pfaller MA. Performance of fusidic acid (CEM-102) susceptibility testing reagents: broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods as applied to *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(3):972-6.
320. Howden BP, Grayson ML. Dumb and Dumber—The Potential Waste of a Useful Antistaphylococcal Agent: Emerging Fusidic Acid Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2006;42(3):394-400.
321. Salimova EV, Magafurova AA, Tretyakova EV, Kukovinets OS, Parfenova LV. Indole Derivatives of Fusidane Triterpenoids: Synthesis and the Antibacterial Activity. *Chem Heterocycl Compd* 2020;56(6):800-4.
322. Krishnasamy G, Azahar M-S, Rahman S-NSA, Vallavan V, Zin NM, ve ark. Activity of aurisin A isolated from *Neonothopanus nambi* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Saudi Pharm J.* 2023;31(5):617-25.


323. Mar Soe W, Lin Myint N, Chu Sing L, K. Sakharkar M, Hock Tang T, ve ark. Ethyl Gallate as a Combination Drug Can Overcome Resistance in MRSA. *Lett Drug Des Discov.* 2011;8(1):65-8.
324. Kyaw BM, Arora S, Lim CS. Bactericidal antibiotic-phytochemical combinations against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Braz J Microbiol.* 2012;43(3):938-45.
325. Ahmed IS, Elnahas OS, Assar NH, Gad AM, El Hosary R. Nanocrystals of Fusidic Acid for Dual Enhancement of Dermal Delivery and Antibacterial Activity: In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics.* 2020;12(3).
326. Thakur K, Sharma G, Singh B, Chhibber S, Patil AB, ve ark. Chitosan-tailored lipidic nanoconstructs of Fusidic acid as promising vehicle for wound infections: An explorative study. *Int J Biol Macromol.* 2018;115:1012-25.
327. Yaseen A, Ghareeb M, Alsaffar DF, Parumasivam T, Toh S-M, ve ark. Fusidic Acid/Tea-Tree Oil Nanoemulsions: A Potentially Safe and Effective Anti MRSA/MSSA Topical Agent for Chronic Wound Healing. *Sains Malays.* 2022;51:1861-73.
328. Holmbäck J, Rinwa V, Johansson J, Håkansson J, Rinwa P, ve ark. Preclinical development of sodium fusidate antibiotic cutaneous spray based on water-free lipid formulation system. *Eur J Pharm Sci.* 2022;176:106250.
329. Rajapakse RDN, Weerasekara TA, Wijayaratne WGB, Nandasiri GK. Microencapsulated sodium fusidate to impart antibacterial properties into cotton dressings for traumatic wounds. *J Wound Care.* 2022;31(1):99-109.
330. Cevher E, Orhan Z, Sensoy D, Ahiskali R, Kan PL, ve ark. Sodium fusidate-poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres: preparation, characterisation and in vivo evaluation of their effectiveness in the treatment of chronic osteomyelitis. *J Microencapsul.* 2007;24(6):577-95.
331. Kaur J, Kour A, Panda J, Harjai K, Chhibber S. Exploring Endolysin-Loaded Alginate-Chitosan Nanoparticles as Future Remedy for Staphylococcal Infections. *AAPS PharmSciTech.* 2020;21.
332. Gondil VS, Harjai K, Chhibber S. Investigating the potential of endolysin loaded chitosan nanoparticles in the treatment of pneumococcal pneumonia. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2021;61:102142.
333. Malekian M, Fahimi H, Niri NM, Khaleghi S. Development of Novel Chimeric Endolysin Conjugated with Chitosan-Zn-Metal–Organic Framework Nanocomposites with Antibacterial Activity. *Appl Biochem Biotechnol.* 2024;196(2):616-31.
334. Fischetti VA. Lysin Therapy for *Staphylococcus aureus* and Other Bacterial Pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;409:529-40.
335. Schuch R, Lee HM, Schneider BC, Sauve KL, Law C, ve ark. Combination therapy with lysin CF-301 and antibiotic is superior to antibiotic alone for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced murine bacteremia. *J Infect Dis.* 2014;209(9):1469-78.

336. Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(3):1225-8.
337. Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, ve ark. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis.* 2007;196(8):1237-47.
338. Thakur K, Sharma G, Singh B, Jain A, Tyagi R, ve ark. Cationic-bilayered nanoemulsion of fusidic acid: an investigation on eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 33591 infection in burn wound. *Nanomedicine (Lond).* 2018;13(8):825-47.
339. Revin VV, Nazarova NB, Tsareva EE, Liyaskina EV, Revin VD, ve ark. Production of Bacterial Cellulose Aerogels With Improved Physico-Mechanical Properties and Antibacterial Effect. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* 2020;8.
340. Dhivya S, Padma VV, Santhini E. Wound dressings—a review. *BioMedicine.* 2015;5(4):22.
341. Youn C, Archer NK, Miller LS. Research techniques made simple: mouse bacterial skin infection models for immunity research. *J Invest Dermatol.* 2020;140(8):1488-97. e1.
342. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14(2):49.
343. Rieck B, Bates D, Zhang K, Escott N, Mougenot C, ve ark. Focused ultrasound treatment of abscesses induced by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: feasibility study in a mouse model. *Med Phys.* 2014;41(6):063301.
344. Mohammad M, Na M, Hu Z, Nguyen MT, Kopparapu PK, ve ark. *Staphylococcus aureus* lipoproteins promote abscess formation in mice, shielding bacteria from immune killing. *Commun Biol.* 2021;4(1):432.
345. Krishna S, Miller LS. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Semin Immunopathol.* 2012;34(2):261-80.
346. Fournier B, Philpott DJ. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(3):521-40.
347. Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, Ramos RI, Farzam DM, ve ark. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1762-73.
348. Miller LS, Cho JS. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):505-18.
349. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501.

350. Mohamed MF, Seleem MN. Efficacy of short novel antimicrobial and anti-inflammatory peptides in a mouse model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) skin infection. *Drug Des Devel Ther.* 2014;8(null):1979-83.
351. Shibue Y, Kimura S, Kajiwara C, Iwakura Y, Yamaguchi K, ve ark. Role of interleukin-17 in a murine community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia model. *Microbes and Infection.* 2019;21(1):33-9.
352. Cho JS, Zussman J, Donegan NP, Ramos RI, Garcia NC, ve ark. Noninvasive in vivo imaging to evaluate immune responses and antimicrobial therapy against *Staphylococcus aureus* and USA300 MRSA skin infections. *J Invest Dermatol.* 2011;131(4):907-15.

8. EKLER

EK-1 : Etik Kurul Kararı

		<p>T.C. ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu</p>		
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI				
TOPLANTI TARİHİ	: 05/04/2023			
TOPLANTI NO	: 2023-7			
DOSYA NO	: 2023-54			
KARAR NO	: 2023-7-61			
<p>Yürütücülüğünü Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Sevdâ ŞENEL'in yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ, Doç. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU, Doç. Dr. Ceren ÖZKUL KOÇAK ve Arş. Gör. Ece TÜRKMEN'in katıldığı "Metisiline dirençli Staphylococcus aureus MRSA kaynaklı deri enfeksiyonların tedavisi için topikal uygulanacak ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi" başlıklı çalışma Üniversite senatosununun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre değerlendirilmiş ve çalışmanın aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.</p>				
Hayvan Türü	: Fare			
Hayvan Sayısı	: 84			
Geçerlilik Süresi	: 09/05/2023-09/05/2024			
ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Prof. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
<p>Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2183</p>				

Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K
Doç. Dr. Neşe Nuray TOPRAK (Üye)	Yemler ve Hayvan Besleme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K

EK-2 : Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası

583/5798




Hayvan Deneysel Merkezi Etik Kurulu

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Sayın ECE TÜRKMEN



06.03.2019 - 22.03.2019 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi HADYEK tarafından Ankara İlinde düzenlenen "Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası" eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. SEMA ÇALIŞ
HADYEK BAŞKANI

Prof. Dr. Haluk ÖZEN
Rektör



A KATEGORİSİ

Hayvan Deneysel Merkezi Etik Kurulu

Ders Adı	Ders Saati	
	Teorik	Uygulama
Mevzuat, Etik, Hayvan Davranışları ve 3R*	3	
Deneysel hayvanların anatomisi, fizyolojisi, histolojisi ve biyokimyası	5	4
Kan ve örnek alma teknikleri	1	4
Tutuş teknikleri	1	4
İlaç verme ve enjeksiyon teknikleri	1	4
Anestezi ve ötenazi teknikleri	2	4
Ağrı, istrap, sıkıntı ve insani sonlandırma noktalarının belirlenmesi	2	
Laboratuvar işleyişi (temizlik, güvenlik, çalışma sağlığı)*	2	4
Deneysel hayvanların beslenmesi	2	
Hayvan hastalıkları a) mikrobiyolojik, virolojik, parazitolojik, mikolojik b) klinik dışı virüsler c) sağlık tarama programları	4	4
Biyostatistik (mümkün olan en düşük hayvan sayısının belirlenmesi)*	2	
Standardizasyon a) Genetik standardizasyon b) Mikrobiyolojik standardizasyon c) Bakım-bardıma d) Araştırma	3	
Spesifik deneysel modelleri	4	4
Hayvan deneysel tasarlama*	2	4
Temel Cerrahi	2	
Deneysel hayvanların yetiştirilmesi	2	4
Alternatif Yöntemler*	2	
TOPLAM	40	40

Başarı Puanı : 87

Sertifikanın geçerli olduğu hayvan türü/türleri : Fare (Mus musculus) , Sığan (Rattus norvegicus) , Kobay (Cavia porcellus) , Tavşan (Oryctolagus cuniculus)

Bu Sertifika Orman ve Su İşleri Bakanlığı'nın 30.11.2017 tarih ve 2017/7 sayılı Genelgesiyle uygun olarak düzenlenmiştir.

EK-3 : Yayın Bilgisi

Journal of Drug Delivery Science and Technology 80 (2023) 104116

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)




Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst



A safe bioadhesive system for topical delivery of combined antimicrobials in treatment of skin infections in veterinary medicine

Ece Türkmen ^a, Selin Parmaksız ^a, Şeyma Nigiz ^b, Meral Sağıroğlu ^b, Sevda Şenel ^{a,*}

^a Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, Turkey
^b Department of Pharmaceutical Microbiology, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Keywords:
Skin infection
Chitosan
Combined antimicrobials
Topical delivery
Gel
Nanoparticle

ABSTRACT

Bacterial and fungal skin infections are common both in humans and animals, especially in companion animals such as cats and dogs. Use of systemic antimicrobial drugs for the treatment of skin infections has resulted in increased antimicrobial resistance (AMR) in both animals and humans. Under "One Health" approach, one of the strategies to overcome AMR is topical delivery of combined antimicrobials, which allows enhanced efficacy at lower amounts of antimicrobials. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus pseudintermedius* (*S. pseudintermedius*), *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*) and *Microsporum canis* (*M. canis*) related skin infections are very common in cats and dogs, and this also poses a risk for humans who come into contact with the infected animals. Chlorhexidine digluconate (CHX) and miconazole nitrate (MN) are amongst the commonly used antimicrobials used for topical treatment of such dermal infections. In this study, we aimed to develop a safe bioadhesive system for delivery of combination of CHX and MN for topical treatment of skin infections providing higher antimicrobial efficacy than that of the currently available formulations. For this purpose, gel formulations were prepared using a bioadhesive biopolymer, chitosan which itself exerts antimicrobial activity as well as anti-inflammatory and penetration enhancing properties. Tris-EDTA was also incorporated into the formulations to increase the antimicrobial activity. Furthermore, CHX loaded chitosan nanoparticles were also prepared and incorporated into the gels in combination with MN. The formulations were investigated in regard to their applicability, spreadability and safety properties as well as their drug release profiles, and the antimicrobial activity of the formulations was shown against *S. aureus* ATCC 29213, *S. pseudintermedius*, *M. pachydermatis* and *M. canis*. Gels with a suitable viscosity, adhesion and spreadability properties for topical application on the skin, which would provide frequency of application was obtained without showing any cytotoxicity. Different release profiles were obtained for CHX and MN. Due to its low solubility, MN release was found to be low, whilst with CHX, release was found to be higher and rapid when incorporated as a solution, but sustained release was obtained when incorporated into chitosan nanoparticles. It was found that both MN and CHX accumulated on the surface of the membrane. By this means, a prolonged release on the site of application would be provided resulting in enhanced antimicrobial activity. The antimicrobial activities against all the pathogens tested were found to be significantly increased with the combination MN and CHX, when compared to the drugs alone, and this activity was further enhanced in presence of Tris-EDTA. Moreover, gels incorporated with CHX loaded chitosan nanoparticles were found to enhance the antimicrobial activity further. We have shown that the developed chitosan-based formulation with combined antimicrobials is a promising local delivery system for treatment of skin infections against wide range of microorganisms and can be safely used both in veterinary and human medicine.

1. Introduction

WHO reports show that antimicrobial resistance (AMR) is increasing worldwide and has become a long-term threat to human health, food production and sustainable development [1]. As most of the antimicrobials used in the treatment of human infections are also applicable in the veterinary medicine, AMR is a global health problem for animals as well [2,3]. Furthermore, due to the increased contact between animals

* Corresponding author.
E-mail address: ssenel@hacettepe.edu.tr (S. Şenel).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104116>
Received 6 September 2022; Received in revised form 28 November 2022; Accepted 22 December 2022
Available online 29 December 2022
1773-2247/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

EK-4 : Tez Çalışması Orijinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: Metisiline Dirençli Staphylococcus Aureus Kaynaklı Deri Enfeksiyonların Tedavisi İçin Topikal Biyoadeziv Jel Formülasyonlarının Geliştirilmesi

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Ece Türkmen

DOSYANIN TOPLAM SAYFASI: 211 sayfa

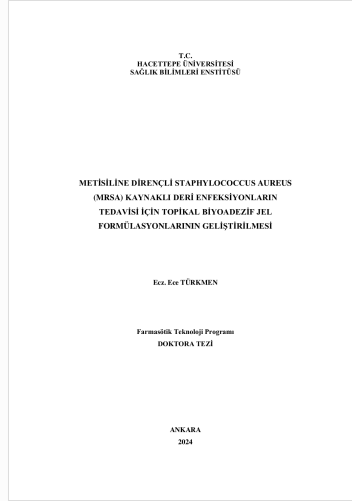
Turnitin Orijinallik Raporu					
İşleme kodu: 09-Eki-2024 01:30 +03 NUMARA: 2479475698 Kalime Sayısı: 45447 Gönderildi: 1	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Benzerlik Endeksi</th> <th>Kaynağa göre Benzerlik</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>%7</td> <td> İnternet Sources: %7 Yayımlar: %4 Öğrenci Ödevleri: %3 </td> </tr> </tbody> </table>	Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik	%7	İnternet Sources: %7 Yayımlar: %4 Öğrenci Ödevleri: %3
Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik				
%7	İnternet Sources: %7 Yayımlar: %4 Öğrenci Ödevleri: %3				
<p>METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) KAYNAKLI DERİ ENFEKSİYONLARIN TEDAVİSİ İÇİN TOPIKAL BİYOADEZİF JEL FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ Ece Türkmen tarafından</p>					
<p>1% match (15-Haz-2024 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/bitstream/handle/11655/34535/10309890.pdf?isAllowed=y&sequence=3</p>					
<p>1% match (24-Ara-2022 tarihli internet) http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/3866/Ecz.%20Ayben%20I%20c%59%9%4%b1lay%20c%39620%4%9eAlisAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (17-Eki-2023 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11655/28545/10246168.pdf?isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (18-Eki-2023 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11655/4095/10171761.pdf?isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (15-Haz-2024 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/bitstream/handle/11655/34656/Meryem%20Kaplan%20Doktora%20Tezi.pdf?isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (15-Haz-2024 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/bitstream/handle/11655/33944/Ayberk%20Y%20c%4b0mzas%4b1z.pdf?isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (17-Eki-2023 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11655/29343/Cansu%20G%20c%3b6nc%3bcoc%49flu_Tez_Referans_No_10317964_.pdf?isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (15-Haz-2024 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/bitstream/handle/11655/34780/T%20c%3bcrkiye%20e%20%99de%20Yeti%20%9f%20Baz%20%4b1%20Arachis%20Resveratrol%20ve%20Polidatin%20Analizi.pdf?isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (18-Eki-2023 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11655/33555/10416160.pdf?isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (10-Oca-2024 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/11655/34378/10229206.pdf?isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (17-Nis-2024 tarihli internet) https://openaccess.hacettepe.edu.tr/bitstream/handle/11655/33671/TEZ_BAC_070723%20bas%4b1ma%20haz%4b1%20hali%20mzas%4b1z.isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (24-Ara-2022 tarihli internet) http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/27011/Safye%20AKKIN%20Tez.pdf?isAllowed=y&sequence=1</p>					
<p>< 1% match (26-Eki-2021 tarihli internet) http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/22546/Kerem%20Polat%20%208Onay%20Sayfas%4b1z%29_.pdf?isAllowed=y&sequence=5</p>					
<p>< 1% match (16-Mar-2023 tarihli internet) http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/28559/DR%20TEZ%20CD%20ve%20K%20c%3bct%3bcphaneye%20Y%20c3isAllowed=y&sequence=3</p>					
<p>< 1% match (05-Eki-2022 tarihli internet) http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080/xmlui/bitstream/handle/11655/5970/Naile%20%20C%396gt%20C%3bCrk_Tez.pdf?sequence=1</p>					
<p>< 1% match (02-Eki-2022 tarihli internet) https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500.12812/492817/yokAcikBilim_415092.pdf?isAllowed=y&sequence=-1</p>					
<p>< 1% match (26-Eyl-2022 tarihli internet) https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500.12812/488137/yokAcikBilim_10321774.pdf?isAllowed=y&sequence=-1</p>					
<p>< 1% match (04-Eki-2022 tarihli internet) https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500.12812/143117/yokAcikBilim_10233060.pdf?isAllowed=y&sequence=-1</p>					
<p>< 1% match (13-Mar-2022 tarihli internet) https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500.12812/477850/yokAcikBilim_10120454.pdf?isAllowed=y&sequence=-1</p>					
<p>< 1% match (03-Eki-2022 tarihli internet) https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500.12812/147358/yokAcikBilim_311567.pdf?isAllowed=y&sequence=-1</p>					
<p>< 1% match (24-Eyl-2022 tarihli internet) https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500.12812/476999/yokAcikBilim_460851.pdf?isAllowed=y&sequence=-1</p>					
<p>< 1% match (15-Eki-2022 tarihli internet) https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500.12812/495586/yokAcikBilim_189889.pdf?isAllowed=y&sequence=-1</p>					
<p>< 1% match (05-Eki-2022 tarihli internet) https://acikbilim.yok.gov.tr/bitstream/handle/20_500.12812/250629/yokAcikBilim_10329351.pdf?isAllowed=y&sequence=-1</p>					
<p>< 1% match (04-Eki-2022 tarihli internet)</p>					

EK-5 : Dijital makbuz**Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Ece Türkmen
Assignment title: METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) KA...
Submission title: METİSİLİNE DİRENÇLİ STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) KA...
File name: Ece_Turkmen_doktora_tezi.docx
File size: 26.26M
Page count: 211
Word count: 45,447
Character count: 299,682
Submission date: 09-Oct-2024 12:51AM (UTC+0300)
Submission ID: 2479475698



9. ÖZGEÇMİŞ

