

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORAL ÜLSER TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE USNİK
ASİT İÇEREN BUKKAL FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE
IN VITRO - *IN VIVO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI

Yüksek Lisans Tezi

Eczacı

Nesrin HÖKENEK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sinem Yaprak KARAVANA

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR

İZMİR

2018

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ORAL ÜLSER TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE USNİK
ASİT İÇEREN BUKKAL FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE
IN VITRO - *IN VIVO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI

Yüksek Lisans Tezi

Eczacı

Nesrin HÖKENEK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Sinem Yaprak KARAVANA

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR

İZMİR

2018

TEZ ONAY SAYFASI

Kurum Adı : Ege Üniversitesi

Anabilim Dalı : Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Program : Yüksek Lisans Programı

Tez Konusu : Oral Ülser Tedavisinde Kullanılmak Üzere Usnik Asit İçeren
Bukkal Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve In Vitro In Vivo Değerlendirilmesi

Danışman : Doç.Dr. Sinem Yaprak KARAVANA
Doç.Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR

Tezi Hazırlayan : Nesrin HÖKENEK

Değerlendirme Kurulu Üyeleri :

Adı Soyadı

Başkan(Danışman)

Üye / İmza

Üye / İmza

: Doç.Dr. Sinem Yaprak KARAVANA

: Prof.Dr. Özgen ÖZER

: Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY ERGİNER

Tezin Kabul Edildiği Tarih : 08.11.2018

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, anlayış ve desteğini her zaman hissettiren sevgili danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Sinem Yaprak KARAVANA'ya,

Tez çalışmalarımı tamamlamamda yardımcı olan, her türlü sorunumda bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyip çözüm yolu gösteren, bana karşı her zaman anlayışlı olan sevgili Hocam, ikinci danışmanım Sayın Doç. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR'a,

Anlayış ve desteğini her zaman hissettiren değerli Hocam Ege Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Özgen ÖZER'e,

In vivo çalışmalarımla bana yol gösteren, çalışmalarım planlanmasından yapılmasına kadar yanımda olup destek olan Dr. Mehmet Evren OKUR'a,

In vivo çalışmalarımın histopatolojik incelemelerinde bana yardımcı olan İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Bölümü öğretim üyesi Dr. Şule AYLA'ya,

Mikrobiyoloji çalışmalarımda bana yardımcı olan Dr. Ayşegül YOLTAŞ'a,

Gösterdikleri anlayış ve destek için çalışma arkadaşlarım, Dr. Muhammet Davut ARPA, Araş. Gör. Emre Şefik ÇAĞLAR, Araş. Gör. Vildan YOZGATLI, Araş. Gör. Ecehan ONAY, Ecz. Yüksel ANTEPÜZÜMÜ'ne,

Bütün hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, fedakarlık ve sevgisini esirgemeyen canım ailem annem, babam ve kardeşlerime,

Birtanecik yeğenlerim Can HÖKENEK ve Atlas HÖKENEK'e,

Her zaman sonsuz sevgisi ve ilgisiyle bana her konuda destek olan Yalınalp COŞKUNMERİÇ'e

Sonsuz teşekkür ederim.

Nesrin HÖKENEK

ÖZET

Oral ülserler, ağız içindeki mukozal tabakanın kaybıyla karakterize edilmektedir. Bu kayıp; akut veya kronik, lokalize veya yaygın olabilmektedir. Birinci basamakta ortaya çıkan en yaygın ağız problemlerinden biridir ve bir takım hastalıkların sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir. Bunlara neden olabilecek çok çeşitli sistemik bozukluklar olduğu gibi, bu lezyonların oluşmasında orofarenks çevresindeki problemler de sebep olmaktadır.

Ağız içinde oluşan ülseratif yaraların topikal tedavisinde, kullanılan formülasyonların ağızda kalış süresi kısa olmaktadır. Çalışmamız, oral ülser tedavisinde kullanılan formülasyonların uygulama bölgesinde daha uzun süre kaldığı, dolayısıyla uygulama sıklığının azaltıldığı, etkin, güvenilir bir formülasyonu sunmayı amaçlamaktadır. Bu nedenle biyouyumlu, biyoadeziv polimerler kullanılarak usnik asit içeren yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirildi. Dermal yara tedavisinde kullanılan usnik asitin, oral ülser tedavisindeki etkisini araştırılması hedeflendi. Etkin maddenin analizleri yapılarak, kalibrasyon ve validasyon çalışmaları ile çalışmaya başlanması tasarlandı. Nanojel formülasyonları farklı yöntemler ile hazırlandı ve bu formülasyonların zeta potansiyeli, polidispersite indeksi, partikül boyutu gibi karakterizasyon özelliklerine bakılarak optimum formülasyonlar seçildi. Seçilen optimum formülasyonlara usnik asit etkin maddesi yüklendi ve etkin madde yüklenen formülasyonların karakterizasyon çalışmaları, fiziksel özellikleri, reolojik özellikleri, biyoadeziv özellikleri, *in vitro* salım çalışmaları, *ex vivo* çalışmaları yapıldı. Fiziksel stabilitesi de incelenen ve geliştirilen optimum usnik asit yüklü nanojel formülasyonunun, tavşanların ağız içerisinde oluşturulan ülseratif yara üzerindeki, yara iyileştirici özelliği *in vivo* olarak incelendi.

Anahtar Kelimeler: Oral ülser, nanojel, bukkal formülasyonlar, usnik asit

ABSTRACT

Oral ulcers are characterized by the loss of the mucosal layer in the mouth. This loss can be acute or chronic, localized or common. Oral ulcer is one of the most common oral problems in primary care and may occur as a result of a number of diseases. As well as a variety of systemic disorders that may cause oral ulcers, problems in the oropharynx surrounding the formation of these lesions are also caused.

Commercial formulations used in the topical treatment of ulcerative wounds stay short time in the mouth. Our study aims to present an effective, reliable formulation in which the formulations used in the treatment of oral ulcers remain in the application site for a longer period of time, and therefore the frequency of administration is reduced. Therefore, new drug delivery systems containing usnic acid were developed in the nanogel formulations using biocompatible, bioadhesive polymers. The analysis of the active substance was carried out and it was planned to start with calibration and validation studies. Nanogel formulations were prepared by different methods and the optimum formulations were selected their characterization such as zeta potential, polydispersity index and particle size. Usnic acid was loaded into the selected optimum formulations and characterization studies, physical properties, rheological properties, bioadhesive properties, *in vitro* release studies, *ex vivo* studies of the formulations were performed. The optimum usnic acid-loaded nanogel formulation were examined *in vivo* studies on the ulcerative wound in the mouth of the rabbits.

Key words : Oral ulcer, nanogel, buccal formulations, usnic acid

İÇİNDEKİLER

TEZ DEĞERLENDİRME KURULU	II
ÖNSÖZ.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
Şekiller Listesi.....	X
Tablolar Listesi.....	XII
KISALTMALAR.....	XIV
BÖLÜM I	1
GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.GENEL BİLGİLER	2
1.1.Oral Mukoza.....	2
1.1.1.Yapısı ve Özellikleri	2
1.2. Bukkal Sistemler	4
1.2.1 İdeal Bukkal İlaç Sistemlerinin Özellikleri.....	5
1.2.2 Bukkal İlaç Sistemlerinin Avantajları.....	5
1.2.3 Bukkal İlaç Sistemlerinin Dezavantajları.....	6
1.2.4. Limitleri	7
1.2.5 İlaç taşıma mekanizması	7
1.2.6 Bukkal Olarak Uygulanan Formülasyonlar.....	8
1.2.6.1. Yarı Katı Preparatlar	8
1.2.6.2. Yama	8
1.2.6.3. Tablet	9
1.2.6.4. Spreyler	9
1.2.6.5. Sıvı dozaj formları.....	10
1.2.7 Biyoadezyon.....	10
1.2.7.1.Mukoadezyon Teorileri.....	10
1.2.7.2. Biyoadezyona Etki Eden Faktörler	12
1.2.7.3. Biyoadezyon Ölçüm Yöntemleri.....	15
1.2.7.4. POLİMERLER.....	18

1.3. NANOJEL.....	22
1.3.1. Nanojellerin Özellikleri.....	23
1.3.2. Nanojellerin Sınıflandırılması.....	25
1.3.3. Nanojellerin Hazırlama Yöntemleri	25
1.3.4. Nanojel İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonları.....	27
1.3.5. Nanojel Uygulamaları	29
1.4. ORAL ÜLSER.....	33
1.4.1. Oral ülser nedenleri	34
1.4.2. Ağız içinde görülen ülseratif hastalıklar	34
1.4.3. Tedavi.....	36
1.5. USNİK ASİT.....	38
1.5.1. Fiziksel Özellikler	38
1.5.2. Farmakolojik Özellikler ve Etki Mekanizması	39
2. GEREÇ YÖNTEM.....	42
2.1 Kullanılan Kimyasal Madde Araç ve Gereçler	42
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	42
2.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler.....	42
2.2 Yöntem ve Deneyler	43
2.2.1 UA'nın Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	43
2.2.1.1 UA'nın Infrared (IR) Analizi	43
2.2.1.2 UA'nın Ultraviyole (UV) Analizi	43
2.2.1.3 UA'nın Lipid/Su Partisyon Katsayısı Tayini	43
2.2.1.4 Etkin Maddenin Çözünürlük Tayini.....	44
2.2.2 UA'nın Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları	44
2.2.2.2 HPLC mobil fazın hazırlanması	45
2.2.2.3 Validasyon Çalışmaları	45
2.2.2.3.1. Doğrusallık	45
2.2.2.3.2. Kesinlik.....	46
2.2.2.3.3. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik.....	46
2.2.3. UA'nın Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini	47
2.2.4. Formülasyon Çalışmaları	47
2.2.5. Nanojel Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi Çalışmaları	50
2.2.5.1 Formülasyonların Fiziksel Görünüşü	51
2.2.5.2 Formülasyonların Partikül/Damlacık Büyüklüğünün Saptanması	51
2.2.5.3 Formülasyonların Zeta Potansiyelinin Saptanması	51

2.2.5.4 Formülasyonların pH Ölçümleri	51
2.2.5.5 Formülasyonların Kırılma İndisi Ölçümü	51
2.2.5.6 Optimum Formülasyonlara Etkin Madde Yüklenmesi.....	51
2.2.5.7 İçerik Miktar Tayini	51
2.2.5.8 AFM ile Yapılan Morfolojik Analiz Çalışmaları	52
2.2.6. Optimum Formülasyonların Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	52
2.2.8. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	52
2.2.9. <i>Ex vivo</i> Çalışmalar.....	53
2.2.9.1. Permeasyon ve Penetrasyon Çalışmaları.....	53
2.2.9.2. Optimum Formülasyonların <i>Ex vivo</i> Biyoadezyon Özelliklerinin Ölçülmesi	54
2.2.10. Stabilité Çalışmaları.....	55
2.2.11. <i>In Vitro</i> Antibakteriyal Etkinlik Tayini.....	55
2.2.12. <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	56
2.2.13. Histopatolojik Çalışmalar.....	57
BÖLÜM III	59
3. BULGULAR	59
3.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular	59
3.1.1 UA'nın Infrared (IR) Analizi	59
3.1.2 UA'nın Ultraviyole (UV) Analizi	59
3.1.3 UA'nın Lipid/Su Partisyon Katsayısı Tayini	60
3.1.4. UA'nın Çözünürlük Deneyi Bulguları	60
3.2 HPLC Yöntem Validasyonu Bulguları.....	60
3.2.1 Doğrusallık Bulguları.....	60
3.2.2 Kesinlik Bulguları	61
3.2.2.1. Tekrar edilebilirlik sonuçları	62
3.2.2.2. Tekrar Elde Edilebilirlik Bulguları	63
3.2.3. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik sonuçları.....	64
3.3. UA'nın Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini	65
3.4. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	66
3.4.1. Optimum Formülasyonlara UA Yüklenmesi ve Fiziksel Görünüşü	66
3.4.2. Karakterizasyon Çalışmaları	67
3.4.2.1. Formülasyonların Partikül/Damlacık Büyüklüğünün Saptanması	68
3.4.2.2. Formülasyonların Zeta Potansiyelinin Saptanması	69
3.4.2.3. Formülasyonların pH Ölçümleri	70
3.4.2.4. Formülasyonların Kırılma İndisi Ölçümü	71
3.4.2.5. İçerik Miktar Tayini	71

3.4.2.6. Optimum Formülasyonların AFM ile Yapılan Morfolojik Analiz Çalışmaları	72
3.4.3. Optimum Formülasyonların Kayma Oranına Bağlı Viskozite Değişimi	75
3.4.4. Optimum Formülasyonlarının Akış Özelliklerinin Tayini	77
3.5. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	80
3.6. <i>Ex Vivo</i> Çalışmalar	81
3.6.1. Permeasyon ve Penetrasyon Çalışmaları	81
3.6.2. Optimum Formülasyonların Biyoadeziv Özelliklerinin Ölçülmesi	81
3.7. Stabilitate Çalışmaları	83
3.8. <i>In Vitro</i> Antibakteriyal Etkinlik Tayini	85
3.9. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	86
3.10. Histopatolojik İncelemeler	88
BÖLÜM IV	90
4.TARTIŞMA	90
4.1. Genel Değerlendirme	90
4.2. UA'nın Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi	91
4.3. HPLC ile UA'nın Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları	91
4.4. UA'nın Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini	92
4.5. Formülasyon Çalışmaları	92
4.6. Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları	93
4.6.1. Optimum Formülasyonlara Etkin Madde Yüklenmesi	95
4.6.2. Optimum Formülasyonların Reolojik Özelliklerinin İncelenmesi	96
4.7. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	96
4.8. <i>Ex Vivo</i> Çalışmalar	97
4.8.1. Penetrasyon ve Permeasyon Çalışması	97
4.8.2. <i>Ex Vivo</i> Biyoadezyon Özelliklerinin İncelenmesi	98
4.9. Stabilitate Çalışmaları	98
4.10. <i>In Vitro</i> Antibakteriyal Etkinlik Tayini	98
4.11. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	99
BÖLÜM V	101
SONUÇ ve ÖNERİLER	101
TEZ ÇALIŞMASINDAN SUNULAN POSTER BİLDİRİLERİ	116
ÖZGEÇMİŞ	117

Şekiller Listesi

Şekil 1: Ağız boşluğunun şeması (3)	3
Şekil 2. Oral mukozanın bir kesiti (9).	4
Şekil 3. Bukkal ilaç uygulamasında penetrasyon yollarının şematik gösterimi (4).	8
Şekil 4. A. minor oral ülser, B. major oral ülser lezyonları (89).	34
Şekil 5. Usnik asidin yapısı.	39
Şekil 6. <i>In vitro</i> salım çalışması	53
Şekil 7. Texture Analyzer cihazı görüntüsü	54
Şekil 8. Oral ülser modelinin oluşturulması.	57
Şekil 9. UA'ya ait IR spektrumu.	59
Şekil 10. UA'nın 240 nm dalga boyunda pH 6.8 tamponunda çizilen kalibrasyon eğrisi.	61
Şekil 11. Nanojel formülasyonlarının fiziksel görünüşü.	66
Şekil 12. Nanojel formülasyonlarına %4 CMC a/h eklendikten sonraki görünüşü ...	67
Şekil 13. UA yüklenmeyen F13 formülasyonuna ait partikül büyüklüğü dağılımı ...	69
Şekil 14. UA yüklenen F13 formülasyonuna ait partikül büyüklüğü dağılımı	69
Şekil 15. F4 formülasyonuna ait 2 boyutlu AFM görüntüsü	72
Şekil 16. F10 formülasyonuna ait 2 boyutlu AFM görüntüsü	73
Şekil 17. F13 formülasyonuna ait 2 boyutlu AFM görüntüsü	73
Şekil 18. F4 formülasyonuna ait 3 boyutlu AFM görüntüsü	74
Şekil 19. F10 formülasyonuna ait 3 boyutlu AFM görüntüsü	74
Şekil 20. F13 formülasyonuna ait 3 boyutlu AFM görüntüsü	75
Şekil 21. F4 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi	75

Şekil 22. F10 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi	76
Şekil 23. F13 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi	76
Şekil 24. F28 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi	77
Şekil 25. F31 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi	77
Şekil 26. F4 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi	78
Şekil 27. F10 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi	78
Şekil 28. F13 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi	79
Şekil 29. F28 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi	79
Şekil 30. F31 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi	80
Şekil 31. In vitro salım testi sonuçları.....	80
Şekil 32. F10 formülasyonunda mukoadesyon tayininde kullanılan kuvvet-mesafe eğrisi.....	82
Şekil 33. F13 formülasyonunda mukoadesyon tayininde kullanılan kuvvet-mesafe eğrisi.....	82
Şekil 34. F13 formülasyonunun <i>B. cereus</i> gram pozitif bakterisine karşı etkinlik sonuçları.....	86
Şekil 35. Kontrol günlerinde gruplardaki ülser alanlarının görüntüsü.....	87
Şekil 36. Ülser alanının günlere göre ölçülmesi.	87
Şekil 37. Histopatolojik inceleme sonucu oral ülser dokusunun ışık mikroskobu görüntüleri.....	88
Şekil 38. Gruplar arasında oral ülser iyileşmesinin histolojik skorlaması	89

Tablolar Listesi

Tablo 1. Mukozaya yapışan ilaç taşıyıcı sistemde kullanılan polimer örnekleri (32).	20
Tablo 2. Yüksek sıcaklıkta asidik pH'da hazırlanan nanojel formülasyonları	48
Tablo 3. İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan nanojel formülasyonları	49
Tablo 4. Kitosan β -gliserol fosfat nanojel formülasyonları	50
Tablo 5. UA'nın çözünürlük çalışması sonuçları.....	60
Tablo 6. UA'nın hazırlanan standart çözeltisinin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait kesinlik bulguları.....	62
Tablo 7. HPLC validasyon çalışmaları tekrar edilebilirlik sonuçları: 1. ve 2. gün....	63
Tablo 8. HPLC validasyon çalışmaları tekrar elde edilebilirlik bulguları	63
Tablo 9. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları	65
Tablo 10. UA'nın MİK sonuçları	66
Tablo 11. Hazırlanan formülasyonların karakterizasyon sonuçları	67
Tablo 12. Etkin madde yüklenen ve yüklenmeyen formülasyonların partikül büyüklüğü, pdi ve zeta potansiyeli sonuçları.....	70
Tablo 13. Formülasyonların viskozite, pH ve kırılma indisi sonuçları.....	71
Tablo 14. İçerik miktar tayini testi ait bulgular.....	71
Tablo 15. Ex vivo permeasyon ve penetrasyon sonuçları.....	81
Tablo 16. F10 ve F13 formülasyonları için ex vivo biyoadezyon çalışması ile elde edilen biyoadezyon işi ve biyoadezif kuvvet sonuçları	81
Tablo 17. F4 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları.....	83
Tablo 18. F10 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları	83
Tablo 19. F13 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları	84

Tablo 20. F28 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları.....	84
Tablo 21. F31 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları.....	84
Tablo 22. %4 CMC içeren F10 formülasyonuna ait stabilite sonuçları.....	85
Tablo 23. %4 CMC içeren F13 formülasyonuna ait stabilite sonuçları.....	85



KISALTMALAR

BSA	: Sığır Serum Albumin
CMC	: Karboksi Metil Selüloz
CS	: Kitosan
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
GİS	: Gastrointestinal Sistem
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HPMC	: Hidroksipropil Metil Selüloz
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
RAS	: Rekürrent aftöz stomatit
TPP	: Tripolifosfat
UA	: Usnik Asit
β -GF	: β -Gliserol fosfat
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
UV	: Ultraviole
VK	: Varyasyon Katsayısı

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Tez çalışmamızdaki amacımız, oral ülser tedavisinde kullanılmak üzere piyasada ürünü bulunmayan bir etkin madde ile yeni bir dozaj şekli önermektir. Antimikrobiyal özelliği bulunan, yapılan literatür araştırmasında topikal olarak yara ve yanık tedavisinde kullanıldığı görülen bir etkin madde olan usnik asidin oral ülserlerde etkinliğinin araştırılması hedeflendi. Bu amaçla, usnik asidin nanojel formülasyonlarının geliştirilmesi planlandı. Formülasyonun ağızda kalış süresinin uzun olması amacıyla biyoadezif polimerler ile nanojel formülasyonları denendi, optimum formülasyonların tavşanlarda oluşturulan oral ülserlerde denenmesi hedeflendi.

Oral ülserler; akut veya kronik olarak görülebilen, sıklıkla ağız mukozasının herhangi bir yerinde lokalize, gastrointestinal sistem ve ürogenital bölgede de görülebilen, değişik çap ve görünümde olabilen mukoza epitelinin bazen alt dokulara uzanan kaybı ile karakterize lezyonları oral ülser olarak tanımlanır.

Klasik dozaj formları oral kavite içerisinden tükürük, yutma refleksi ile uzaklaşabilmektedir. Oral ülser lezyonlarının topikal tedavisinde, mukozaya yapışan dozaj formlarının kullanılması daha anlamlı olacaktır.

1.GENEL BİLGİLER

1.1.Oral Mukoza

1.1.1.Yapısı ve Özellikleri

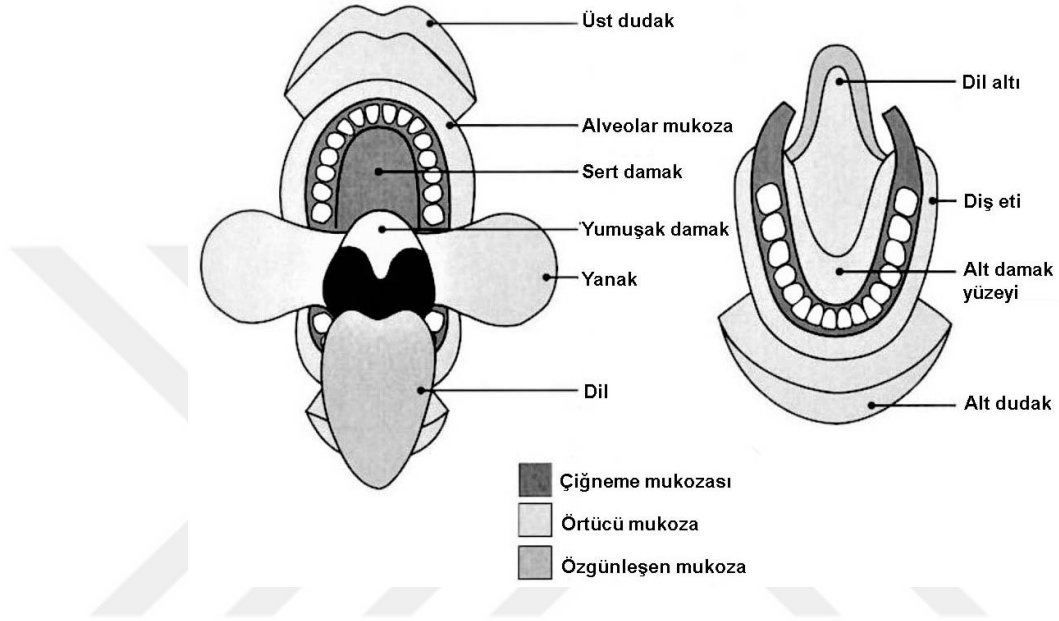
Ağız boşluğu; dudak, yanak, dil, sert damak, yumuşak damak ve ağız tabanını içermektedir. Ağız boşluğunun astarı ağız mukozası olarak adlandırılmakta ve yanak, dil altı, diş eti, palatal ve labial mukozayı kapsamaktadır (Şekil 1). Dudak ventral yüzeyindeki bukkal, dil altı ve mukozal dokular, oral mukozal yüzey alanının yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadır. Oral mukozanın en üst çeyreği, sıkı sıkıya bağlanmış epitel hücrelerden oluşmaktadır. Oral epitelin temel fonksiyonu, altta yatan dokuyu ağız ortamındaki potansiyel zararlı ajanlara ve sıvı kaybına karşı korumaktır (1).

Oral mukozanın iki ana tabakası, yani epitel ve alttaki bağ dokusu (lamina propria olarak adlandırılır) cildin epidermisine ve dermisine eşdeğerdir. Çoğu oral dokuda, lamina proprianın hemen altında bir submukoza tabakası bulunabilir ve bu dokudan ayırt edilmesi kolay değildir. Epidermise benzer şekilde, oral epitel, dökülen hücrelerin yerini alması için sürekli hücre yenilenmesi gerçekleşir ve hücrenin en derin tabakalardan yüzeye doğru büyümesi süreciyle yapısal bütünlüğünü korur (2).

Oral mukoza epitelinin keratinizasyonundaki bölgesel farklılıklara sahip olması nedeniyle birçok benzersiz fonksiyonu bulunmaktadır. Çiğneme ile ilişkili mekanik kuvvetlere maruz kalan bölgelerde (diş eti ve sert damak) dayanıklılığı sağlayan deriyi örten epidermise benzeyen keratinize epitel doku bulunur. Bu çiğneme mukozasındaki keratinize epitel, altta yatan dokulara, kollajenöz bir bağ dokusu ya da lamina propria ile sıkıca bağlanır. Çiğneme, konuşma veya bolusun yutulması için esneklik gerektiren ağızın yanak bölgeleri ve özofagus zemini keratinize olmayan epitel ile kaplıdır. Astar mukozasının bağ dokusu, çiğneme mukozasındaki bağ dokusundan daha elastik ve esnektir. Dilin sırt kısmı, keratinize ve keratize olmayan epitelin mozaik bir şekilde karışımı ile oluşan özel bir epitel ile kaplıdır. Bu epitel dil kasına sıkıca bağlıdır (3).

Keratinizasyon farklılıklarının yanı sıra, doku kalınlığı ve hücre döngüsü süresi açısından bölgesel farklılıklar da vardır. Keratinize olmayan bir doku olan bukkal

epitelin kalınlığı insanlarda, köpeklerde ve tavşanlarda yaklaşık 500-800 µm arasındadır. Dil altı ve diş eti mukozasının kalınlık değeri ise 100-200 µm arasındadır (4,5).



Şekil 1: Ağız boşluğunun şeması (3)

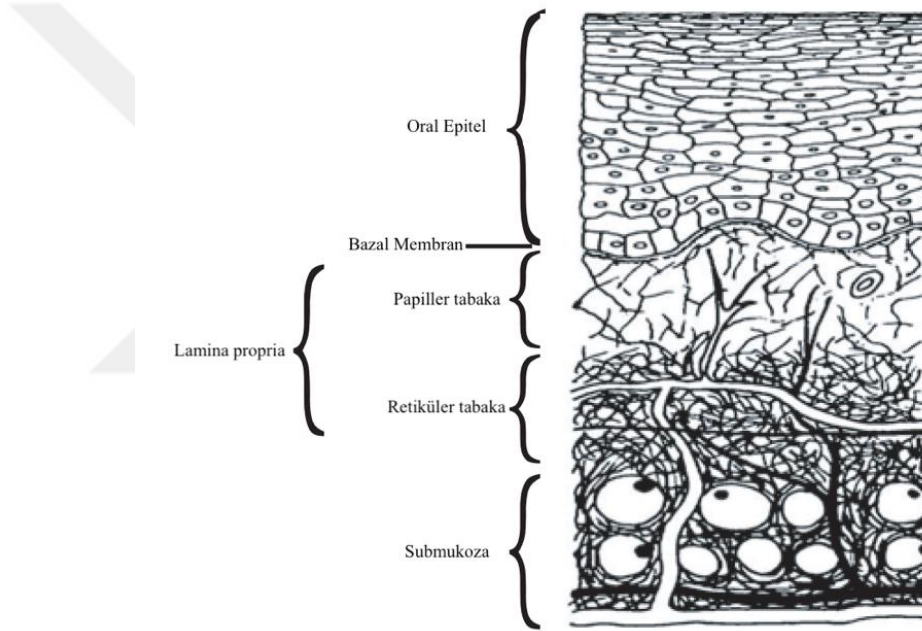
Tükürük: Oral kaviteye tükürük salgılayan parotis (kulak altı), submandibular (çene altı) ve sublingual (dil altı) olmak üzere üç büyük tükürük bezi vardır. Minör tükürük veya bukkal bezler, mukozanın içinde veya hemen altındadır. Parotis ve submandibular bezleri sulu bir salgı verirken, dil altı bezleri sınırlı enzim aktivitesi olan viskoz (musin içeren) tükürük üretir. Tükürük, ağız yapısını kayganlaştırarak kaygan bir yiyecek bolusunun oluşmasını sağlar ve yutmayı kolaylaştırır. Ayrıca dişlerin demineralizasyonunun önlenmesini, karbonhidrat sindirimini (amilazlar yoluyla), oral pH'ı ayarlayarak ve yumuşak doku onarımı yaparak ve içerdiği antimikrobiyal ajanlar (immünoglobülinler IgA, IgM ve IgG ve antimikrobiyal peptidler, histatinler, lizozim, laktoferrin, peroksidazlar, SLPI) ile oral mikrobiyal floranın düzenlenmesini sağlar (6,7).

Oral mukoza boşluğu içinde, ilaçların verilmesi üç kategoriye ayrılır (8).

(i) ilaçların ağız tabanını kaplayan mukozal membranlardan sistemik olarak verilmesi olan dil altı uygulaması,

(ii) yanakları (bukkal mukoza) kaplayan mukozal zarlardan ilaç uygulaması olan bukkal uygulama,

(iii) ağız boşluğuna ilaç iletimi olan lokal dağıtım.



Şekil 2. Oral mukozanın bir kesiti (9).

1.2. Bukkal Sistemler

“Bukkal” terimi, toplam ağız mukozal yüzeyinin üçte birini temsil eden yanağın, üst ve alt dudakların astarlarını kapsamaktadır (4). Bukkal boşluk, ilaçların uygulanması için çekici bir yol teşkil etmektedir. Mevcut çeşitli mukozal membranlar arasında yanak mukozası, hem yerel hem de sistemik etkilerde terapötik

maddelerin verilmesi için en elverişli ve kolayca erişilebilir durumdadır. Ayrıca, bu yol ilk geçiş metabolizmasını atlar ve ilaçların sistemik biyoyararlanımı geliştirerek iç juguler damar yoluyla sistemik dolaşıma doğrudan erişim imkanı sağlar. Bukkal yol, oral olmayan diğer ilaç yolları ile karşılaştırıldığında yüksek bir hasta kabul edilebilirliğine sahiptir (10).

Bukkal salımın gerçekleşmesindeki başlıca zorluk, farmasötik formun ağız ortamında kalma süresidir. Dozaj formlarının, ilaçların bukkal alanda hareket etmesi veya mukoza yoluyla emilmesi için mukoza zarıyla temas etmesi gerekir. Bununla birlikte, ağız ortamındaki tükürük akışı, çiğneme, yutkunma, konuşma gibi nedenlerle oral mukozaya yapışmayı önleyebilir. Buna bağlı olarak ilaçların ağız boşluğundan kaybolması veya ilacın etkisizliği görülebilmektedir. (5).

1.2.1. İdeal Bukkal İlaç Sistemlerinin Özellikleri

Bukkal bölgeye uygulanan formülasyonlar;

- Birkaç saat boyunca konulan bölgeye yapışmalıdır.
- İlacı kontrollü bir şekilde serbest bırakmalıdır.
- Mukozaya doğru tek yönlü bir şekilde ilaç salımı sağlamalıdır.
- İlaç emiliminin hızını ve derecesini kolaylaştırmalıdır.
- Hastada tahriş veya rahatsızlık yaratmamalıdır.
- Konuşmak, içmek gibi normal işlevlere müdahale etmemelidir

(11).

1.2.2. Bukkal İlaç Sistemlerinin Avantajları

Bukkal ilaç dağıtım sistemi geleneksel ilaç verme sistemlerine göre aşağıdaki avantajlara sahiptir:

- Dozaj formunun emilim bölgesindeki kalış süresini artırır, dolayısıyla biyoyararlanımı artırmaktadır.
- Kullanabilirliği artırır ve hızlı etki görülmesini sağlar.
- Büyük kan akımı ve iyi perfüzyon oranları nedeniyle hızlı absorpsiyon göstermektedir.
- İlacın, gastrointestinal sistemin (GİS) asidik ortamında bozunmaya karşı alternatif ve güvenli bir oral yol sağlamaktadır.

- Hastalar tarafından tercih edilebilmektedir.
- Hızlı hücresel toparlanma ve lokal bölgenin iyileşmesini sağlar.
- Doz sıklığını azaltır.
- Tedavi süresinin kısalmasını sağlar.
- Plazma seviyelerinin daha iyi kontrolü sayesinde yüksek mukavemetli ilaçların emniyet marjı geliştirilir.
- Uygulanan ilacın toplam miktarındaki azalmayı kolaylaştıran ilacın aşırı kullanımını azaltır.
- Bilinç altı ve travma hastasında da ilaç uygulanabilmektedir.
- İlaçlar ilk geçiş metabolizmasından etkilenmeyerek biyoyararlanımı arttırmaktadır.
- Mide asidik ortamda kararsız olan bazı ilaçlar yanak yoluyla verilebilmektedir.
- Pasif difüzyon ile ilaç absorpsiyonu sağlanmaktadır.
- Emici membran ile yakın temastan dolayı maksimum emilim oranı sağlanmaktadır. (12,13).

1.2.3. Bukkal İlaç Sistemlerinin Dezavantajları

Bukkal ilaç iletim yoluyla ilişkili dezavantajlar:

- Dil altı membrana kıyasla bukkal membranın düşük geçirgenliktedir ve daha küçük bir yüzey alanına sahiptir.
- İlaç emilimi için mevcut ağız boşluğunun membranlarının toplam yüzey alanı 170 cm²'dir 50 cm² bukkal membran da dahil olmak üzere keratinize olmayan dokuları temsil etmektedir.
- Tükürüğün kesintisiz salınımı (0.5-2 L/gün) ilacın seyreltilmesine yol açar. Tükürüğün yutulması ayrıca potansiyel olarak çözünmüş veya asılı ilacın kaybolmasına ve sonuçta dozaj formunun istemsiz uzaklaştırılmasına yol açabilmektedir.

Bunlar bukkal ilaç sistemleri ile ilgili bazı sorunlardır. Hastanın yemek yerken veya içerken, böyle bir dozaj formunun rahatsızlığının yanı sıra istemsiz yutma sistemi ile boğulma tehlikesinin olması da bir endişe kaynağıdır (14).

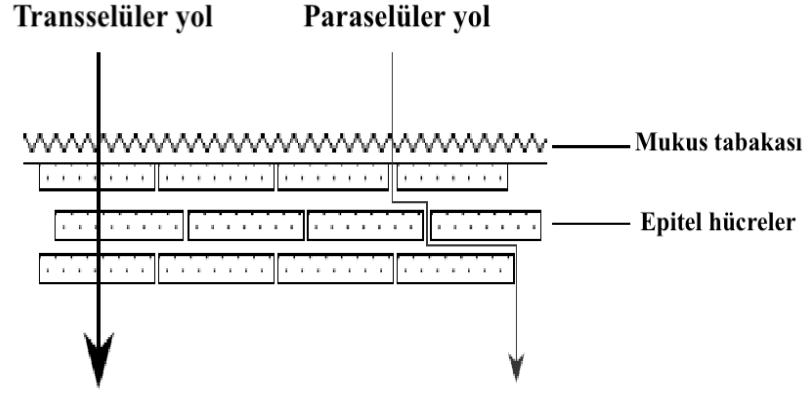
1.2.4. Limitleri

Bukkal yol üzerinden ilaç uygulaması belirli sınırlamaları vardır:

- Mukozayı tahriş eden, acı ya da tatsız bir tat veya kötü kokusu olan ilaçlar verilemez.
- Bukkal pH'ta bozunan ilaçlar verilemez.
- Sadece küçük bir dozda kullanılan ilaçlar uygulanabilmektedir.
- Yutulan tükürükte bulunan ilaç, peroral yol izler ve bukkal yolun avantajları kaybolur.
- Sadece pasif difüzyonla absorbe olan ilaçlar uygulanabilir.
- Yeme ve içme kısıtlanabilir.
- Hastanın dozaj şeklini yutması olasılığı vardır.
- Emilim için mevcut yüzey alanı daha azdır.
- Bukkal mukoza ince bağırsak, rektum vb. göre nispeten daha az geçirgendir.
- Fazla nemlendirme kaygan yüzey oluşmasına neden olabilir ve formülasyonun yapısal bütünlüğü biyoadeziv polimerlerin şişmesi ve hidrasyonu ile bozulabilir (15).

1.2.5. İlaç taşıma mekanizması

Bukkal mukozadan etkin maddenin taşınma mekanizması, iki ana yol içerir: transselüler (hücre içi) ve paraselüler (hücrelerarası) yollar (Şekil 3). Transselüler yol, hücre zarından bir polar ve bir lipid alanıyla geçişi içerirken, paraselüler yol esas olarak hücre dışı lipid alanı boyunca pasif difüzyonu kapsar. Genel olarak, hücre dışındaki lipid matrisinin, özellikle de bileşikler hidrofilik olduğu ve peptitler gibi yüksek bir moleküler ağırlığa sahip olduğu durumlarda, paraselüler yolağın bariyer işlevinde önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (16).



Şekil 3. Bukkal ilaç uygulamasında penetrasyon yollarının şematik gösterimi (4).

1.2.6. Bukkal Olarak Uygulanan Formülasyonlar

Bukkal dozaj şekilleri yarı katılar, çözeltiler, tabletler, yamalar ve tozları içermektedir.

1.2.6.1. Yarı Katı Preparatlar

Jeller ve merhemler gibi yarı katı dozaj şekilleri oral mukozada kolay dağılma avantajına sahiptir. Bununla birlikte, yarı katı dozaj formlarından alınan ilacın dozu, tabletler, yamalar veya filmlerde olduğu kadar doğru olmayabilmektedir. Uygulama alanındaki jellerin zayıf tutulması, mukoadezif polimerler kullanılarak aşılmıştır. Hidrojeller de bukkal ilaç sisteminde umut verici bir dozaj formudur. Oral mukozaya uygulanan jeller, sistemik analjeziklerin, antihipertansiflerin ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların yanı sıra antifungal ajanlar ve antiinflamatuvarlar ilaçların oral mukozaya topikal uygulanması amacıyla yarı katı preparatlar hazırlanmıştır (17,18).

1.2.6.2. Yama

Dozaj formları olarak yamalar, ilaç sistemlerinde yeni, hasta dostu ve kullanışlı ürünler olarak önem kazanmıştır. Yakın zamanlarda, geliştirilmiş mekanik özellikleri sayesinde, oral yoldan parçalanan yamalar ortaya çıkmıştır. Yamalar, çoğunlukla özel paketlemeye ihtiyaç duyan ve ticarileştirilmiş oral olarak parçalanan tabletlere

kıyasla daha az kırılğan dozaj şekilleridir. Küçük boyutları ve kalınlıkları nedeniyle tabletlere kıyasla hasta uyumluluğunu iyileştirmişlerdir. Mukoadezif özelliğinden dolayı bukkal mukozaya yapışma imkanı olduğu için yamalar sistemik veya lokal bir etki gösterecek şekilde formüle edilebilmektedir. Birçok mukoadezif bukkal yama, oral kandidiyazis gibi, ağız boşluğundaki mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için lokal olarak ilaç salacak şekilde formüle edilmiştir. Üretim proseslerinin çok yönlülüğü nedeniyle, salım ya bukkal mukozaya doğru ya da ağız boşluğuna doğru yönlendirilebilmektedir. Bu durumda, GİS yolu ile kontrollü salım sağlayabilmektedir. Alternatif olarak, filmler ilacın bukkal mukozaya doğru serbest bırakılması için formüle edilebilmektedir. İlacın bukkal mukozaya doğru serbest bırakıldığı filmler ilk geçiş etkisinden kaçınma avantajını ortaya koymaktadır (19).

1.2.6.3. Tablet

Tabletler, bukkal mukozada bulunan tükürüğün dehidrasyonu ile biyoadezif özelliği kazanır. İlacın bukkal mukozaya veya ağız boşluğuna lokal olarak salımı ve sistemik bir etki elde edilmesi için biyoadezif özelliklere sahip tabletler son yıllarda geliştirilmiştir. Mukoadezif tabletler, biyoadezif polimerlerin, etkin maddeyle doğrudan karıştırılıp sıkıştırılmasıyla, katı solüsyonlar ile veya biyoadezif polimerler ve ilaç dispersiyonları ile hazırlanmış solventlerin püskürterek kurutulmasıyla hazırlanabilir (20). Esneklik ve hasta konforu açısından tercih edilebilecek yamak yamaları veya filmlerden farklı olarak tabletler, çözücü kullanımı nedeniyle çevresel kaygılar olmadan direkt sıkıştırma ile kolaylıkla ve hızlı bir şekilde hazırlanabilir böylece zaman kazandırır ve pahalı hazırlık prosedürüne ihtiyaç duymamaktadır (21).

1.2.6.4. Spreyler

Bukkal spreyler çeşitli isimlerle adlandırılmaktadır. Bunlar aerosol spreyler, sıvı pompası spreyleri veya aktifleştirilmiş buğulardır. Bukkal spreyler, mukoza tarafından hızlı ilaç emilimi için bir gaz veya çözücü taşıyıcı bir araçla bir çalıştırma pompası veya aerosol bulunduran ilaç dozaj şekilleri olarak tanımlanmaktadır. Bu tür sistemler için uygun ilaç adayları arasında nöroleptikler, kardiyovasküler ajanlar, antidiyabetikler, analjezikler, antialerjikler ve erektil disfonksiyon için ilaçlar yer alır (22).

1.2.6.5. Sıvı dozaj formları

Ağız içine uygulanan sıvı dozaj formları çözeltiler veya süspansiyonlardır. Bu tip dozaj formları genellikle ağız boşluğuna lokal etki için kullanılır. Bu amaçla kullanılan antibakteriyel ağız gargarası ve ağız temizleyiciler piyasada bulunmaktadır. Bu sıvı dozaj formları ile ilişkili sınırlama, kolayca tutulmamış veya bukkal mukozaya hedeflenmemiş olmaları ve ağız boşluğu boyunca nispeten kontrolsüz miktarlarda ilaç verebilmeleridir. Viskoz sıvılar, yanak yüzeyini koruyucu olarak veya ilaç taşıyıcı sistemler olarak mukozal yüzeye kaplamak için kullanılabilir (4).

1.2.7. Biyoadezyon

Biyoadezyon, ara yüzey kuvvetler tarafından uzun süreler boyunca bir arada tutulan biri biyolojik iki yüzey arasında gerçekleşen olaydır. Polimer ve epitel yüzey arasında etkileşim olduğundan genellikle biyoadezyon adı verilir. Epitel yüzey bir dokuyu örten mukus tabakası ise bu olaya mukoadesyon denir. Biyoadezif sistemler oral kavitede uzun süre yüksek etkin madde konsantrasyonu sağlaması açısından en yaygın kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerden biridir (23,24).

1.2.7.1. Mukoadesyon Teorileri

Mukoadesyon olaylarını açıklamak için kullanılan birkaç genel teori vardır:

- Elektronik teori;** mukoadesif polimer ve mukusun farklı elektronik karakteristiklere sahip olduğu ve elektronların transferi, elektriksel çift tabaka oluştuğu ve karşıt yüklü yüzeyler arasında elektrostatik çekim ile sonuçlandığı zaman geçerli olabilen teoridir.

- Adsorpsiyon teorisinde;** mukus ve mukoadesif polimerler arasındaki çekimin, hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleri gibi spesifik etkileşimler yoluyla sağlandığı düşünülmektedir. Hidrofobik etkiler, özellikle mukoadesif polimerlerde amfifilik özellikte olduğunda önemli bir rol oynayabilmektedir. Adsorpsiyon teorisi, mukoadesif polimer ve münisler arasında kuvvetli kovalent bağlar oluştuğunda, kimyasal absorpsiyon olasılığını da göz önüne almaktadır (25).

- Islatma teorisi;** sıvı sistemlere uygulanmakta, yüzey ve arayüzey enerjileri değerlendirilmektedir. Yapışkanlığın gelişimi için bir sıvının bir

yüzey üzerine kendiliğinden yayılması kabiliyetini içerir. Bir sıvının bir yüzey için afinitesi, yüzeydeki sıvının temas açısını ölçmek için temas açısı goniometri gibi teknikler kullanılarak bulunabilir; genel kural, temas açısı ne kadar düşük olursa sıvının katıya daha fazla bağlı olmasını sağlar (Smart, 2005).

•**Kırılma teorisinde;** sistemler arasındaki adezif bağ, her iki yüzeyi de birbirinden ayırmak için gereken kuvvetle ilgilidir. Bu "kırılma teorisi", mukustan polimer ayırma kuvvetini adezif bağ kuvvetine ilişkilendirir. Kırılma, polimer ağ şeritleri daha uzun olduğunda veya sistem içindeki çapraz bağlanma derecesi düştüğünde daha büyük bulundu. Bu teori, Young'ın elastikiyet modülü (E), kırılma enerjisi (e) ve kritik çatlak uzunluğu (L) ile ilişkisi yoluyla iki yüzün ayrılmasını takiben kırılma mukavemetinin (r) belirlenmesini sağlar. Eşitlik aşağıda görülmektedir (27)

$$\text{Eşitlik 1. } \sigma = \left(\frac{Ex\varepsilon}{L} \right)^{1/2}$$

•**Difüzyon teorisi;** biyoadezif polimer zincirleri ve mukoza polimer zincirleri arasındaki iç içe geçme ve dolanma kavramını desteklemektedir. Bağlanma mukavemeti penetrasyon derecesinin artmasıyla birlikte artar. Bu penetrasyon oranı, difüzyon katsayısına, esnekliğe ve mukoadezif zincirlerin yapısına, hareket kabiliyetine ve temas süresine bağlıdır. Literatürde, etkili biyoadezif bir bağ oluşumu için gerekli nüfuz etme derinliği 0.2-0.5 µm aralığında bulunur. Polimer ve mûsin zincirlerinin bu içe penetrasyon derinliği denklem ile tahmin edilebilmektedir.

$$\text{Eşitlik 2. } \iota = (tD_b)^{\frac{1}{2}}$$

burada, t temas süresidir ve Db, mukoadezif maddenin mukustaki difüzyon katsayısıdır. Bir polimerin yapışma mukavemeti, penetrasyon derinliği polimer zinciri boyutuna yaklaşık olarak eşdeğer olduğunda ulaşılmaktadır (17).

1.2.7.2. Biyoadezyona Etki Eden Faktörler

1.2.7.2.1. Polimere İlişkin Faktörler

Molekül ağırlığı ve Çapraz Bağ Yoğunluğu

Polimerin mukoadezif özellikleri polimerik zincirin moleküler ağırlığı arttıkça artmaktadır. Bir polimerin biyoadezif gücü, moleküler ağırlığının 100.000 Da'nın üzerinde arttığı gösterilmektedir (14,28).

Ortalama gözenek büyüklüğü, çapraz bağlanmış polimerlerin ortalama moleküler ağırlığı ve çapraz bağlanma yoğunluğu, bir polimer ağının üç önemli ve birbiriyle ilişkili yapısal parametresidir. Bu nedenle, çapraz bağlanma yoğunluğunun artmasıyla, polimer ağına suyun difüzyonu daha düşük bir oranda gerçekleşir bu sebeple polimerin yetersiz bir şekilde şişmesine ve polimer ile mûsin arasındaki geçiş oranının azalmasına neden olmaktadır (14).

Aktif polimer konsantrasyonu

Maksimum biyoadezyon sağlamak için mukoadezif polimerin optimum konsantrasyonuna ihtiyaç vardır. Yoğunlaştırılmış sistemde, optimum seviyenin ötesinde, yapışkanlık mukavemeti önemli ölçüde düşer, çünkü sarmal moleküller ortamdan ayrılır, böylece iç içe geçme için kullanılabilen zincir sınırlı olur. Mukus tabakasına nüfuz etmek için uzun polimer zincirlerinin kullanılabilirliğini etkiler. Bu esas olarak sıvı ve viskoz ilaç dağıtım sistemi için önemlidir. Bu faktörün önemi, mukusla güçlü bir yapışkan bağı geliştirilmesinde yatmaktadır ve mukus tabakasına nüfuz etmek için mevcut olan polimer zincir uzunluğu ile açıklanabilir. Polimerin konsantrasyonu çok düşük olduğunda, mukusun birim hacmi başına nüfuz eden polimer zincirlerinin sayısı azdır ve polimer arasındaki etkileşim de küçüktür (29)

Polimer zincirlerinin esnekliği

Polimerin esnekliği mukoadезyon özelliği için bir başka önemli faktördür. çünkü zincir polimer uzunluğu, polimer zincirlerinin biyolojik zarın mukozal astarı ile iyi nüfuz etmesini ve bağlanmasını kolaylaştırır ve biyoadezyon özelliğinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır. Polimer zincirlerinin esnekliği genel olarak; polimerin hidrasyon ve çağraz bağ reaksiyonlarından etkilenir. Polimerin çapraz bağ yoğunluğu yüksek olduğunda polimerin zincir esnekliği düşük olmaktadır (28).

Uzaysal konum

Moleküler ağırlık veya zincir uzunluğunun yanı sıra, bir molekülün uzaysal konformasyonu da önemlidir. Dekstranlar, 19.500.000 Da yüksek moleküler ağırlığa rağmen, moleküler ağırlığı 200.000 Da olan PEG'lere benzer bir yapışma mukavemetine sahiptirler. Dekstranın sarmal şekli, lineer bir konformasyona sahip olan PEG polimerlerinden farklı olarak, yapışkanlıktan sorumlu olan bir çok yapışkan aktif grubu koruyabilmektedir (30).

Şişme

Şişme özellikleri mukoza yapısının kendisi ve çevresi ile ilgilidir. Şişme, polimer konsantrasyonuna, iyon gücüne ve suyun varlığına bağlıdır. Dinamik biyoadhezyon işlemi sırasında, optimum su içeriği ile *in vitro* maksimum biyoadhezyon oluşur. Aşırı hidrasyon, yapışma olmaksızın ıslak kaygan bir zamlık oluşumu ile sonuçlanmaktadır (31)

Hidrojen tutma kapasitesi

Genel olarak hidrojen tutumu güçlü ise adezyon da güçlüdür. Bu tür etkileşimden sorumlu fonksiyonel gruplar : hidroksil, karboksil ve amino gruplarıdır (32).

Yük

Polimer yapışkanlığı üzerine yapılan bir çalışmada, hücre kültürü floresans prob tekniği kullanılarak, polimer şarj işaretinin biyoadhezyon için önemli bir element olduğu bulundu. Polimerlerin karboksil gruplarıyla mukoadhezif mukavemeti, nötr gruplara sahip olanlardan çok daha kuvvetli oldu. Biyoadhezif polimerlerin yüküne ilişkin bazı genellemeler yapılmıştır, burada noniyonik polimerler anyonik polimerlere kıyasla daha küçük bir yapışma derecesine maruz kalmaktadır. Peppas ve Buri, polimer üzerinde güçlü anyonik yükün mukoadhezyon için gerekli özelliklerden biri olduğunu göstermiştir. Kitosan gibi bazı katyonik polimerlerin, özellikle nötr veya alkali bir ortamda üstün mukoadhezif özellik sergiledikleri gösterilmiştir (33).

1.2.7.2.2. Çevresel Faktörler

pH

Bazı çalışmalarda, çapraz bağın hidrasyon derecesi için ortamın pH değerinin önemli olduğunu gösterilmiştir. Hidrojen iyonu konsantrasyonu, mukusun yüzeyindeki yükü ve bazı iyonlaşabilen mukoadhezif polimerleri etkileyebilir. Örneğin, polikarbofil, pH 3'te maksimum mukoadhezif mukavemeti gösterir ve pH 5'e kadar arttıkça adeziv özelliği azalmakta olup pH 5'in üzerinde herhangi bir mukoadhezif özelliği göstermemektedir. (34,35).

Uygulanan kuvvet

Başlangıçta mukozaya yapışan dokunun temas bölgesine uygulanan basınç, interpenetrasyon derinliğini etkileyebilir. Eğer yeterli süreden daha uzun bir süre boyunca yüksek basınç uygulanırsa, polimerler müsin ile çekici bir etkileşime sahip olmasalar bile mukozaya yapışabilmektedir (32).

İlk temas süresi

Biyoadhezif ve mukus tabakası arasındaki temas süresi, biyoadhezif polimer zincirlerinin şişmesi ve iç içe geçme derecesini belirler. Ayrıca, başlangıç temas süresi arttıkça biyoadhezyon artar (36).

Nem

Mukozaya yapışan polimerin yüzey üzerinde yayılmasına, polimer ve müsin moleküllerinin iç içe geçmesine, yeterli büyüklükte bir "makromoleküler ağ" oluşturmaya ve polimer zincirlerinin hareketliliğini arttırmaya yönelik olarak neme ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, optimum şişme ve biyoadhezyon ile karakterize olan mukoadhezif polimerler için kritik bir hidrasyon seviyesi vardır (29).

1.2.7.2.3. Fizyolojik Faktörler

Müsin döngüsü

Müsin moleküllerinin doğal döngüsü iki nedenden dolayı önemlidir. Birincisi, müsin döngüsünün mukus tabakasının mukoza tabakasındaki kalma süresini sınırlar. Yapışkanlık mukavemeti yüksek ise mukus yapışması nedeniyle mukozaya

yapışması yüzeyden ayrılır. İkincisi, müsin döngüsü, önemli miktarda çözünebilir müsin molekülü ile sonuçlanır. Bu moleküller mukus tabakası ile etkileşime girme şansına sahip olmadan önce mukoadesyon ile etkileşirler. Müsin döngüsü gıda alımı gibi diğer faktörlere bağlı olabilir (36).

Hastalık durumu

Mukusun fizyokimyasal özelliklerinin, soğuk algınlığı, mide ülserleri, ülseratif kolit ve kadın üreme yolunun kistik fibrozu, bakteriyel ve fungal enfeksiyonları gibi hastalık durumlarında değiştiği bilinmektedir. Bu gibi hastalık durumlarında mukoadesyon etkilenmektedir (37).

1.2.7.3. Biyoadesyon Ölçüm Yöntemleri

Mukozaya tutunma özelliklerinin değerlendirilmesi, yeni ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde temel teşkil etmektedir. Dozaj formlarının mukoadesif özellikleri, geleneksel olarak, gerilme çalışmaları, görsel ayrılma / çözünme zamanı yöntemleri ve akış tutma teknikleri gibi *in vitro* yöntemlerle değerlendirilmiştir.

Biyoadesif ölçüm yöntemleri aşağıda verilmiştir:

- Wilhelmy tablası yüzey gerilim metodu
- Floresans işaretleme metodu
- Değiştirilmiş yüzey gerilim metodu
- Özafagusa yapışma metodu
- Akış kanal metodu
- Gerilme direnci metodu
- Software kontrollü penetrometre (Texture Analyser) metodu

1.2.7.3.1. Wilhelmy tablası yüzey gerilim metodu

Wilhelmy plaka tekniği geleneksel olarak dinamik temas açılarının ölçülmesi için kullanılır. Kellaway ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemde, kullanılan cihaz genel olarak mikroteraziden sarkıtılan bir cam plak ile bir beher, müsin çözeltisi, beherin içinde bulunduğu bir su banyosu ve banyonun tüm bu sistemle beraber üzerinde oturduğu tabladan oluşmaktadır. Mikroteraziden sarkıtılan cam plaklar biyoadesif materyalin %12'lik çözeltisine daldırılır ve ardından plak 60°C'lik etüvde sabit ağırlığa kadar kurutulur. Böylece üzeri ince bir polimer tabakası ile kaplı

1.2.7.3.4. Özefagusa yapışma metodu

Marvola ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem, polimerlerin biyoadezif özelliklerinin incelenmesinden çok, değişik oral dozaj şekillerinin özefagusa adhezyonunu araştırmak amacını taşımaktadır. Birçok katı oral dozaj şekillerinin özefagusa yapışarak özefajit ve ülserasyona neden olduğu bilinmektedir. Bu yöntemde, iki farklı banyo sistemi kullanılmıştır. Ancak her iki sistemde de domuz özefagusu ve oksijen ile havalandırılan 37°C'lik Tyrode solüsyonu kullanılmıştır. Birinci banyoda özefagus segmentinin üst ucu bir tüp yardımıyla açık bırakılmış, alt ucu ise sıkıca bağlanarak kapatılmıştır. Banyo hacmi 50 mL'dir. İkinci banyoda ise özefagusun her iki ucu da bir tüp yardımıyla açık bırakılmış olup, banyo hacmi 2000 mL'dir. Özefagusun içine yerleştirilecek olan dozaj şekli ortasından delinerek, bir bakır tel yardımıyla 500 g kapasiteli teraziye bağlanmakta ve sabit su akışı sağlanarak kopma uygulanmaktadır. Bu yöntem ile şeker kaplama, film kaplama, sert jelatin kapsül v.b. gibi çok çeşitli katı oral dozaj şekillerinin özefagusa adhezyonu incelenebilmektedir (41).

1.2.7.3.5. Akış kanal metodu

Diğer metotlara göre daha hassas olan bu metotta kullanılan teknik kontrollü salım sistemlerinin davranışını çok iyi bir şekilde taklit edebilmektedir.

Bu teknikte, boyu 29.9 cm, eni 4 cm ve yüksekliği 0.4 cm olan bir akış kanalı kullanılmıştır. Kanalin alt kısmındaki termostatlı bir ceket sistemi kanalın sıcaklığını kontrol etmeye imkan sağlamaktadır. Kanalin üst kısmında yer alan kapak, kanal içerisinde 0.4 cm derinliğinde boşluğa, suni veya doğal mukus jeli ve incelenen polimerin yerleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu tekniğin diğerlerinden farkı, incelenen polimerin tek bir mikropartikülü ile çalışmasıdır. Kanal, akış kontrollü bir gaz tüpüne bağlı olup, gaz akışı sırasında partikülün hareketini incelemek amacıyla ışık mikroskobu, video kamerası ve kayıt cihazı ile fotoğraf makinesi kullanılmaktadır. Bu yöntem, kullanılarak mukoza ile 200 µm çapında katı polimerik mikropartiküllerin arasındaki adezif kuvvetler tayin edilmiştir (42).

1.2.7.3.6. Gerilme direnci metodu

Bu yöntem; Ponchel ve arkadaşları tarafından, Dućhene ve arkadaşlarının geliştirdiğı “Instron” gerilim test cihazının değiştirilmesi ile geliştirilmiştir. Instron

cihazının üst hareketli kirişine ve alttaki sabit çene üzerine, T şeklinde metalik dikey sporlar eklenerek cihaz kullanılmıştır. Bu yöntemde; alt destek üzerine, biyolojik substrat, üst desteğin alt yüzeyine ise biyoadezif materyal yerleştirilir. İki destek polimer ile mukozal yüzey temas edecek şekilde, önceden belirlenmiş bir kuvvetle ve sabit süre ile bir arada tutulur. Test sonunda iki yapı birbirinden tamamen ayrılana kadar sabit hızda kuvvet uygulanır. Bu yöntem değişik polimerlerin biyoadezif özellikleri açısından sınıflandırılabilmesine olanak sağlamaktadır (43).

1.2.7.3.7. Software kontrollü penetrometre (Texture Analyser) metodu

Gerilme çalışmalarında, formülasyon mukozal doku ile temas ettirilir ve yapışkan bağı kırmak için gerekli olan kuvvet ölçülmektedir. Bu test için tipik olarak kullanılan aletler modifiye edilmiş balanslar veya gerilme test cihazlarıdır. Bir mukozal dokudan (substrat) bir dozaj formunun ayrılmasının test edilmesine yönelik en uygun yaklaşımlardan biri, Texture Analyser gibi bir otomatik gerilme makinesinin kullanılmasıdır. Bu yöntemin varyantları geliştirilmiş ve farklı tipte formülasyonlar için uygulanmıştır: kuru tabletler, diskler, toz / granüller / parçacıklar ve yarı katı ilaçlar gibi. Tabana bağlı olarak, dozaj formunun yanı sıra substratın geometri ve fiziksel özellikleri deneyleri gerçekleştirmenin farklı yolları ve dozaj formunu ve alt tabakayı emniyete almak için geliştirilmiştir ve malzemelerin sabitlenmesi için bazı aksesuarlar ticari olarak temin edilebilmektedir. Tablet ya da disk gibi bir katı dozaj formu, bir çift yapışkan bant ile bir hareketli metalik prob üzerinde sabitlenebilir ve biyolojik doku bir mukoadesif formülasyona sabitlenebilir (25).

1.2.7.4. POLİMERLER

1.2.7.4.1. Bukkal İlaç Sistemlerinde Kullanılan İdeal Polimerlerin Özellikleri

- Polimer ve bozunma ürünleri toksik, tahriş edici olmamalı ve safsızlık içermemelidir.
- İyi yayılabilirlik, ıslatma, şişme, çözünürlük ve biyobozunurluk özelliklerine sahip olmalıdır.
- Bukkal mukozaya hızlı bir şekilde yapışmalı ve yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olmalıdır.

- Biyodezif aralığında sıyırma, çekme ve kesme kuvvetlerine sahip olmalıdır.
- Polimer kolayca bulunmalıdır ve maliyeti yüksek olmamalıdır.
- Hem kuru hem de çözelti halde biyoadezif özellik göstermelidir.
- Lokal enzim inhibisyonu ve penetrasyon geliştirme özelliklerini göstermelidir.
- Kabul edilebilir raf ömrü göstermelidir.
- Optimum molekül ağırlığına sahip olmalıdır.
- Yapışkan aktif gruplara sahip olmalıdır.
- Mekansal konformasyon gerekli olmalıdır.
- Yeterince çapraz bağlı olmalı, ancak bağ oluşturma gruplarının baskılama derecesine sahip olmamalıdır.
- Diş çürüğü gibi ikincil enfeksiyonların gelişmesine sebep olmamalıdır (44).

1.2.7.4.2. Polimerlerin Sınıflandırılması

Hidrofilik Polimerler: Bunlar, su ile temas halinde süresiz olarak şişen ve sonuçta tam çözünmeye uğrayan suda çözünebilen polimerlerdir.

Hidrojeller: Bunlar, genellikle çapraz bağlanmış ve sınırlı şişme kapasitesine sahip olan, suyla şişebilen polimerlerdir.

Termoplastik Polimerler: Bu polimerler, indirgenemez nötral polistiren ve yarı kristalin biyo aşınabilir polimerleri içerir. Bunlar indirgenirken karboksilik asit gruplarını üretir. Örn. polianhidritler ve polilaktik asit. Biyoadezif formülasyonlarda çeşitli sentetik polimerler kullanılmaktadır. Bunlar; polivinil alkol, poliamidler, polikarbonatlar, polialkilen glikoller, polivinil eterler, esterler ve halojenürler, polimetakrilik asit, polimetil metakrilik asit, metilselüloz, etil selüloz, hidroksipropil selüloz, hidroksipropil metilselüloz ve sodyum karboksi metil selüloz gibi (38).

Tablo 1. Mukozaya yapışan ilaç taşıyıcı sistemde kullanılan polimer örnekleri (32).

No	Polimerin Adı	Moleküler Ağırlığı (Da)	Açıklama	Uygulama
1	Polivinil Pirolidin	2500- 3,000,000	Beyaz, kokusuz ve higroskopik toz	İyi emülsifiye edici ajan, koyulaştırıcı ajan, bağlayıcı ajan
2	Karbopol	$7 \times 10^5 - 4 \times 10^9$	Hafif, beyaz, kabarık, asidik, higroskopik toz	Mükemmel koyulaşma, emülsifiye edici, jelleştirici, bağlayıcı madde, iyi biyoadeziv özelliktedir
3	Sodyum Karboksi Metil Selüloz	90,000 - 70,000	Soluk sarı, kokusuz, higroskopik toz beyaz	Emülsifiye edici, jelleştirici ve bağlayıcı madde olarak, iyi biyoadeziv mukavemetine sahiptir.
4	Metil Selüloz	10,000- 220,000	Beyaz, lifli toz veya granüller. Kokusuz ve tatsız	Oral ve topikal farmasötik formülasyonda kullanılır.
5	Hidroksi Propil Selüloz	60,000- 1,000,000	Beyaz, hafif sarımsı, kokusuz bir toz	Oral olarak kalınlaştırıcı ajan, emülsiyon stabilizörü ve süspansiyon ajanı olarak kullanılır.
6	Kitosan	10,000- 1,000,000	Kokusuz, beyaz veya kremi - beyaz toz	Kozmetik ve farmasötik formülasyonlarda kullanılır ve mukoadesif dozaj formu olan filmler, jel ve tablette kullanılır.
7	Eudragit analoğu	47,000	Şeffaf veya soluk sarımsı renk, kokusuz	İyi emülsifiye edici ajan, bağlayıcı ajan
8	Sodyum Aljinat	220,000	Kokusuz ve tatsız, beyaz sarımsı - kahverengi renkli toz	Emülsiyonlarda, süspansiyon haline getirici, tablet parçalayıcı ve tablet bağlayıcı olarak stabilizatör olarak kullanılır.
9	Kitre	84,000	Düzleştirilmiş, sık sık eğimli parçalar ve beyazdan sarımsı renklerde ve kokusuzdur.	Bir çeşit ilaca emülsifiye edici ve süspanse edici ajan. Krem ve jellerde kullanılır.
10	Jelatin	20,000 - 200,000	Hafif sarı renkli, camsı, kırılkan katı veya kaba toz halinde	Oral uygulamada sert ve yumuşak jelatin kapsüller olarak kullanılır.

11	Ksantan Sakızı	1,000,000	Krem veya beyaz renkli, kokusuz, serbest akışlı, ince toz	Oral ve topikal formülasyonlarda, kozmetikte ve gıdada, süspanse edici ajan, koyulaştırıcı ajan ve emülgatör ajan olarak kullanılır.
----	-------------------	-----------	---	---

Kitosan

Kitosan (CS), ağız mukozasında, biyoadezif özelliklerinden ötürü oral mukozal ilaç verme için uygun bir polimer olup, oral mukozada uzun bir alıkonma süresine sahiptir. Çok yüksek adezif özelliği esas olarak; fizyolojik pH da negatif yüklü müsin ile elektrostatik çekim ve hidrojen bağının hidrofobik etkilerinden kaynaklanmaktadır. CS, kitinin alkalın deasetilasyonu ile elde edilen doğal bir lineer polimerdir. Kimyasal olarak CS, her C6 yapı birimi için bir primer amino ve iki serbest hidroksil grubu olan bir glikozamin ve N-asetil-glukozamin kopolimeridir (45).

Bu doğal polimerin toksik olmaması, biyoyumluluğu ve biyoçözünür olması gibi mükemmel özelliklere sahiptir. Kitosanın bazı polimerik özellikleriyle birleşen bu özellikler, bu polisakkariti doku mühendisliği ve ilaç dağıtım uygulamaları için umut verici bir aday yapmaktadır (46).

Kitosan ile kaplanmış nanopartikül sistemler, özellikle negatif yüklü mukozal yüzey ile etkileşime girme kabiliyetleri, artan tutulma süresi, mukoadezif özellikleri ve ayrıca nanopartiküllerin artan konsantrasyonları nedeniyle mukoadezif uygulamalara ilgi çekmektedir (47).

Hidroksipropil Metil Selüloz

Hidroksipropil metilselüloz (HPMC), ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve kontrollü salım sağlamak için jel bazı olarak kullanılan metoksil ve hidroksipropil grupları içeren bir karışık alkil/hidroksialkil selüloz eterdir. HPMC, yüksek şişme kabiliyeti ve yüzey aktivitesi gibi belirgin özelliklere sahip yarı sentetik iyonik olmayan suda çözünen bir polimerdir. Çok çeşitli moleküler ağırlıkları da mevcuttur. Polimer, oral olarak kontrollü ilaç verme sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan suda çözünebilir önemli bir yardımcı maddedir.

Kalınlaşma özelliğini, pH stabilitesini, su tutma ve yapışma gücünü diğer polimerler ile birlikte kullanıldığında da göstermektedir. Kitosan hidrojelinin (sertlik, viskozite ve biyoadhezyon gibi) fizikokimyasal özellikteki artışı HPMC'nin dahil edilmesiyle kanıtlanmıştır (48,49).

Karboksi Metil Selüloz

Selüloz türevlerinin en önemlilerinden biri olan karboksimetil selüloz (CMC), formülasyon hazırlamada yaygın olarak kullanılan tipik bir anyonik polisakkarittir. CMC, insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri olmayan doğal suda çözünen selüloz türevlerinden biridir. CMC, gıda maddeleri, kozmetik ve ilaç sektörü gibi uygulama alanlarında ürün özelliklerini geliştirmek için oldukça etkili bir katkı maddesi olarak kullanılır. CMC, suda çözünebilmesinin yanı sıra biyolojik ortamda da çözünebilen ve biyolojik olarak uyumlu bir selüloz türevidir. Hidrofilik, karboksilik veya hidroksil grupları, CMC jellerinin hazırlanması için aktif bölgelerdir. Supermoleküler ve iyonik etkileşim yoluyla fiziksel çapraz bağlanan CMC jellerinin üretilmesi kolaydır, ancak genellikle bunların tersinirliği ile sorgulanmaktadır. Kimyasal çapraz bağlama, CMC jellerini daha kararlı bir üç boyutlu ağ sağlamaktadır. (50,51).

1.3. NANOJEL

Nanojeller, kontrollü ilaç salımının yanı sıra ilaç hedeflemede kullanılabilen ve biyomedikal uygulamalarda sıkça kullanılan, potansiyel polimerik nanopartikül sistemlerdir. Yapısal olarak nanojeller, küresel şekilli ve nanometre boyutundadırlar (52). Nanojeller hidrojel ve nanopartiküler sistemlerin özelliklerini bir arada taşımaktadırlar (53). Kimyasal olarak veya fiziksel olarak çapraz bağlıdır ve uygun bir ortamda şişme ve etkin maddeyi salma kabiliyetine sahiptir. Nanojeller, dozlama sıklığını azaltabilecek salım özelliklerine sahiptir ve biyolojik olarak uyumludurlar (54).

Polimer sistemlerin çeşitliliği ve fizikokimyasal özelliklerinin kolay değiştirilmesi, çok yönlü nanojel formülasyonları için avantaj sağlamaktadır. Klinik düzeyde yapılan son çalışmalar nanojellerin umut verici bir değeri olduğunu göstermiştir (55).

Nanojeller hem hidrojellerin hem de nano ölçekli taşıyıcıların çeşitli avantajlarını sergiler. Nanojeller kolaylıkla uygulanabilir ve üç boyutlu bir yapı ile 1-30 kez şişebilir. Nanometre boyutundan ötürü yüksek bir spesifik yüzey alanına sahiptir ve konjüge edilmiş ilaç moleküllerinin çözünürlük ve farmakokinetiklerini artırır (56).

Nanojellere kimyasal reaksiyonlar olmaksızın yüksek miktarda etkin madde yüklenebilmektedir. Bu ilaç aktivitesini korumak için önemli bir faktördür. Küçük hacimlerinden dolayı en küçük kılcal damarlara ulaşabilme, dokulara paraselüler veya transselüler yollardan nüfuz etme kabiliyeti vardır. Dezavantaj olarak hazırlama işleminin sonunda yüzey aktif madde veya monomer izleri kalabilir ve toksisite oluşabilmektedir (57).

1.3.1. Nanojellerin Özellikleri

Biyouyumluluk ve Bozunabilirlik

Nanojeller, yüksek oranda biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir özelliklere sahip formülasyon çeşidi olup günümüzde oldukça umut verici bir alandır (57).

Parçacık Boyutu ve Yüksek İlaç Yükleme Kapasitesi

Nanojeller, özellikle ilaç yükleme açısından diğer nanopartiküllere kıyasla uygun bir nano boyutlu taşıyıcı sistemlerdir. Nanojeller, yüklenecek olan etkin maddenin yokluğunda hazırlanabilir veya sentezlenebilir daha sonra nanojeller şişirildiğinde ve su veya biyolojik sıvı içinde dengelendiğinde verimli bir şekilde hazırlanabilir. İlaç yükleme, nanojellerde kendiliğinden oluşur. Diğer geleneksel nanopartiküllere kıyasla, nanojeller çok daha fazla ilaç yüklemesine izin verir (ağırlığın% 50'sine kadar). Ayrıca, nanojel hazırlama yöntemleri daha basittir ve mekanik enerji veya organik çözücülerin kullanımını içermez (58).

Çözünürlük

Nanojellerin hidrofilik yapısı hidrofobik ilaçların çözünürlüğünde sınırlama getirirse de; polimer yapının uygun şekilde üretilmesi ile, çözünürlüğü düşük antikanser ilaçların yüksek oranda çözünmesini sağlamaktadır. Düşük çözünürlükteki antikanser ilaçlar ayrıca çözünürlüğünü ve stabilitelerini geliştirmek için nanojeller

ile hazırlanabilmektedir. Böylece serbest ilaca göre hücresel alım şanslarını arttırmaktadır. Li ve ark. iki zayıf çözünür antikanser ilacı, paklitaksel (PTX) ve 10 hidroksikamptotesin, Pluronic F127 misellerinin çapraz bağlanmasıyla nanojellere yüklenmiştir. İlaçların nanojele yüklenmesi ile çözünürlükleri artmış, daha stabil, daha iyi hücresel alım sağlanmıştır, bu da serbest ilacın kullanımına kıyasla avantaj sağlamaktadır. (58,59).

Elektromobilité

Nanojeller, biyomakromoleküllerin enkapsülasyonu için kritik olan sonikasyon veya homojenizasyon gibi enerji veya sert koşullar gerektiren işlemler kullanılmadan hazırlanabilmektedir (57).

Kolloidal Stabilité

Nanojeller veya polimerik misel nanojel sistemlerinde, yüzey aktif madde, miseller üzerinde daha iyi bir stabiliteye sahiptir ve daha düşük kritik misel konsantrasyonları, daha düşük ayrışma oranları ve yüklü ilaçların daha uzun tutulmasını sağlamaktadırlar (60).

Diğer

Nanojellerin su içeriği ve biyouyumluluğu yüksektir. Ayarlanabilir kimyasal ve mekanik özellikleri vardır. Ayrıca, mikrometreden nanometreye kadar ayarlanabilir boyuta, biyokonjüjasyon için geniş bir yüzey alanına ve etkin madde yüklemesi için bir iç ağı sahiptirler (61)(62).

Nanojeller, polimerlerin içinde bulunan -OH, -CONH-, -CONH₂- ve -SO₃H gibi hidrofilik grupların varlığı bağlanan yapıları korurken yüksek miktarlarda su veya biyolojik sıvıları emebilme özelliğine sahiptir. Bununla birlikte, nanojeller, çapraz bağların varlığı nedeniyle çözülmek yerine şişme özelliğini göstermektedir. Bu benzersiz özellik, nanojelleri birçok uygulama için umut verici bir aday haline getirmektedir. Çok sayıda çalışma, mükemmel ilaç yükleme kapasitesi, yüksek stabilite, biyolojik tutarlılık ve farmasötik nano taşıyıcılar için çok çeşitli çevresel uyaranlara (iyonik güç, pH ve sıcaklık gibi) yanıt olarak nanojellerin optimum bir ilaç taşıyıcısı olduğunu göstermektedir (63).

1.3.2. Nanojellerin Sınıflandırılması

Nanojeller, çapraz bağlanma türüne, harici uyaranlara (örn., pH, sıcaklık, ışık, iyonik kuvvet vs.) ve hazırlanma yöntemlerine göre çeşitli sınıflara ayrılabilir (64).

Nanojeller, fiziksel veya kimyasal (kovalent olarak) çapraz bağlama yöntemine dayanılarak sınıflandırılmıştır. Kimyasal çapraz bağlama, düşük molekül ağırlıklı monomerlerin polimerizasyonu veya polimer öncüllerinin çapraz bağlanması sırasında polimer zincirleri arasında kovalent bağların oluşmasını içerir. Kimyasal olarak çapraz bağlanmış nanojellerin hazırlanması için en yaygın olarak kullanılan yöntemler, iki fonksiyonlu veya çok fonksiyonlu çapraz bağlayıcıların varlığında heterojen polimerizasyon reaksiyonları kullanmaktır (65).

Fiziksel çapraz bağlı jeller Fiziksel jeller veya yalancı jeller, (a) van der Waals kuvvetleri, (b) hidrofobik, elektrostatik etkileşimler veya (c) hidrojen bağı yoluyla zayıf bağlar tarafından oluşturulur. Fiziksel jeller elde etmek için birkaç basit yöntem mevcuttur. Bu sistemler hassastır ve bu duyarlılık, polimer bileşimi, sıcaklık, ortamın iyonik kuvveti, polimerin konsantrasyonları ve çapraz bağlama maddesine bağlıdır. Amfifilik blok kopolimerleri ve karşıt olarak yüklü polimerik zincirlerin komplekslenmesi, sadece birkaç dakika içinde mikro ve nanojellerin oluşumuyla sonuçlanır. Fiziksel jeller ayrıca polimerik zincirlerin agregasyonu ve / veya kendiliğinden oluşumu ile de hazırlanabilir (57).

1.3.3. Nanojellerin Hazırlama Yöntemleri

Nanojelleri hazırlamak için farklı literatürlerde bir çok farklı yöntem kullanılmıştır. Temel olarak dört ana hazırlama yöntemi incelenecektir.

- 1- Polimerlerin fiziksel etkileşim ile kendiliğinden oluşum yöntemi,
- 2- Homojen fazda veya heterojen faz içinde monomerlerin polimerizasyonu,
- 3- Polimerlerin kimyasal olarak çapraz bağlanması,
- 4- Mikrokalıplama yöntemi ile üretilmesidir.

1.3.3.1. Polimerlerin Fiziksel Etkileşim İle Kendiliğinden Oluşumu

Kovalent çapraz bağlayıcılarla karşılaştırıldığında (glutaraldehit ve formaldehit), iyonik çapraz bağlayıcılar (örneğin, magnezyum sülfat, sodyum sülfat

ve sodyum tripolifosfat (TPP)), kolay hazırlama koşulları ve basit deneysel prosedürleri nedeniyle daha avantajlıdır. Ayrıca düşük moleküler ağırlıklı polianyonlar ve polikasyonlar, polikasyonik ve polianyonik polisakkaritler için iyonik çapraz bağlayıcılar olarak rol oynayabilirler. İyonik çapraz bağlayıcı, polielektrolit polisakkaritleri (hem kasyonlar hem de anyonlar) arasındaki karşı iyonları ile iyonik etkileşim yoluyla bir jel oluşturma eğilimindedir. Ayrıca, reaktiflerin ve diğer istenmeyen etkilerin olası toksisitesinden kaçınmak için, kimyasal çapraz bağlama yerine, elektrostatik etkileşim ile tersine çevrilebilir fiziksel çapraz bağlama uygulanmıştır. Tripolifosfat (TPP), kasyonik CS ile elektrostatik kuvvetler ile etkileşime girebilen bir polianyondur. Bodmeier ve ark., CS damlacıklarını bir TPP çözeltisine bırakarak TPP-CS kompleksinin hazırlanmasını bildirmişlerdir. İyonik jelasyon yönteminde CS, CS kasyonunu elde etmek için sulu asidik çözelti içinde çözülür. Bu çözelti daha sonra sürekli karıştırılarak polianyonik TPP çözeltisine damla damla ilave edilir. Zıt yüklü türler arasındaki komplekslik nedeniyle, CS iyonik jelasyona uğrar ve küresel parçacıklar oluşturmak için çökmektedir (66,67).

1.3.3.2. Homojen Fazda Veya Heterojen Faz İçinde Monomerlerin Polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu, sürekli fazı baz olarak ele aldığımızda, emülsiyon ve ters emülsiyon polimerizasyonuna göre iki kategoriye ayrılmaktadır. İki işlevli monomerler kullanıldığında ve bu heterojen kolloidal sistemlerde polimerizasyon başladığında, nanojeller kimyasal olarak sentezlenebilir. Matyjaszewski grubu, bir disülfür köprülü bifonksiyonel monomeri tanıtan biyo-bozunabilir nanojeller elde etmek için son zamanlarda atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ve emülsiyon polimerizasyonunu birleştirdi. Aynı zamanda yağ miniemülsiyonlarında veya ters miniemülsiyonlarda suda ATRP kullanılarak protein nanojel hibritleri oluşturmak için proteinleri nanojellere kovalent olarak dahil ederler. Özellikle, bir ters miniemülsiyon sisteminde stabil olarak dağılmış olan monomerlerin polimerizasyonunu başlatmak için bir ATRP işlevselliğini taşıyan protein bir yardımcı madde olarak kullanılmıştır (68,69).

1.3.3.3. Polimerlerin Kimyasal Olarak Çapraz Bağlanması

Kimyasal olarak çapraz bağlı nanojeller hazırlanmış ve literatürde rapor edilmiştir. Örneğin, anyonik ve iyonik olmayan polimerler içeren di-blok

kopolimerler, metal iyonları ve bir polion-metal çekirdekli formuna, polimer miselinin eklenmesiyle birleştirilir. Polion çekirdeğinin kimyasal olarak çapraz bağlanmasıyla hazırlanan nanojeller, hücrel ilaç dağıtımı için kullanılmıştır (70).

1.3.3.4. Mikro kalıplama Yöntemi

Hidrojellerin mikro kalıplaması, mikron altı boyutlu mikrojellerin üretilmesi için potansiyel bir yöntem olarak incelenmiştir. Bu yöntemler, fotolitografik tekniklere benzer. Bununla birlikte, pahalı ekipman ve temiz oda tesislerini kullanma ihtiyacını en aza indirebilirler. Ayrıca, bir kalıp damgası üzerindeki özellikleri kontrol ederek, biyomedikal uygulamalar için önemli olan mikrojellerin boyutu ve şekli üzerinde kontrol sağlarlar (71).

1.3.4. Nanojel İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonları

Nanojel ilaç taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu için bir çok nano taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonunda da kullanılan fizikokimyasal özelliklere bakılmaktadır.

1.3.4.1. Partikül boyutu

Nano taşıyıcı sistemler, partikül boyutu açısından farklılık gösterecek şekilde formüle edilebilmektedir. Ekstraksiyon, sonikasyon, homojenizasyon ve / veya donma-çözülme gibi teknikler, farklı ilaç taşıyıcı sistemlerin boyut ve boyut dağılımını kontrol etmek için kullanılmaktadır. Nano taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde fizikokimyasal özellikler, hücrel alım ile kapsüllenmiş terapötik bileşimin biyoyararlanımı üzerinde önemli etkilere sahip olabilmektedir. Partikül boyutu; stabilite, kapsülleme verimliliği, ilaç salım profili, biyoyararlanım, mukoadesiflik ve hücrel alımını etkileyen nano taşıyıcıları için çok kritik bir özelliktir (72,73).

1.3.4.2. Polidispersite İndeksi

Nano taşıyıcı sistemlerin hedef dokuda birikme eğilimi, parçacık boyutu dağılımı dahil olmak üzere fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle, güvenli, istikrarlı ve verimli nanopartiküllerin başarılı formülasyonu, belirli bir büyüklükteki nanopartiküllerin homojen (monodispers) popülasyonlarının hazırlanmasını gerektirir. Bununla birlikte, nano-taşıyıcıların bileşimini ve bunların

hazırlanması sırasında kullanılan çözücüler ve yardımcı çözücüler dikkate alınmadan parçacık boyutu dağılımını kontrol etmek zordur. Formülasyon hazırlandıktan sonra, nano taşıyıcı sistemlerin *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda uygunluklarını sağlamak için karakterize edilmelidir. Parçacık büyüklüğü dağılımı karakterizasyonu bakımından, lipidik nano taşıyıcı sistemlerinin boyut aralığını tanımlamak için kullanılan parametreye “polidispersite index” (PDI) denir. “Polidispersite” terimi, parçacıkların boyut dağılımının eşit olmayan derecesini tanımlamak için kullanılır. Heterojenite indeksi olarak da bilinen PDI, iki parametrelili bir uyumdan korelasyon verilerine hesaplanan bir sayıdır. Bu indekste 0.05'ten küçük değerler esas olarak yüksek monodispers standartlarda görülmektedir. 0.7'den büyük PDI değerleri, numunenin çok geniş bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğunu ve muhtemelen dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği ile analiz edilmek için uygun olmadığını göstermektedir (72).

1.3.4.3. Zeta Potansiyeli

İyonik bir çözelti içinde, yüklü bir parçacığın yüzeyi, gevşek yüklü iyonlardan oluşan bir dış dağınık tabaka tarafından kapsanan ve Stern tabakası adı verilen ince bir sıvı tabakası ile karşı yüklü iyonlara sıkı sıkıya bağlıdır. Bu iki tabaka, elektriksel çift tabakayı oluşturur. Yüklü parçacığın dışsal bir kuvvetin veya Brownian hareketinin yönlendirdiği teğetsel hareket göz önüne alındığında, yüklü parçacıkların hareketi, tabakanın içinde yığın dispersan ile kalan iyonlardan yayılmış tabakadaki yük parçacığı ile göç eden iyonları kesmektedir. Kesme yüzeyindeki elektrik potansiyeli zeta potansiyeli olarak adlandırılır. Bu, genellikle yüklü türlerin hızının, numune çözeltisi boyunca harici bir elektrik alanının mevcudiyetinde elektrota doğru ölçülmesiyle belirlenir. ± 30 mV'lik bir değere sahip olan zeta potansiyeli genellikle 30 mV'den daha büyük mutlak değerlerin stabil bir durumu gösterdiği ve partikül stabilitesini elde etmek için seçilirken, 30 mV'dan daha düşük bir düşük zeta potansiyel değeri kararsızlığa, koagülasyona, flokülasyon oluşumuna veya kümelenmeye doğru bir durumu gösterir (68).

Zeta potansiyelini değerlendirme yöntemleri arasında, sıvı içerisindeki birçok yüklü partikülün hızlarını aynı anda ölçebilen elektroforetik ışık saçılımı (ELS) tekniği en sık kullanılan yöntemdir. Bununla birlikte, ölçümün kesinliğini ve tekrarlanabilirliğini azaltan elektro ozmotik etkiye sahiptir. Seyreltildikten sonra

süspansiyon partiküllerinin zeta potansiyelinin ölçülmesi, numune çözeltisine ışık penetrasyonunun zorluğunu azaltsa da, zeta potansiyelinin pH ve iyonik güç gibi çevresel değişikliklere duyarlı bir özellik olduğunu belirtmek gerekmektedir. Bu nedenle, seyreltilmiş bir çözeltinin zeta potansiyeli ölçümü, konsantre bir süspansiyondaki kesin ve tekrarlanabilir olan gerçek değeri yansıtamamaktadır (74).

1.3.5. Nanojel Uygulamaları

1.3.5.1. Kanser Tedavisi

Son yıllarda kanser alanında ilaç taşıyıcı sistemlerin araştırmalarında olağanüstü bir genişleme görülmüştür. Nanoteknolojinin ilaca uygulanmasının kanser teşhisi ve tedavisinde önemli ilerlemeler sağlayacağı konusunda artan güvence vardır. Kemoterapötiklerin çoğu, toksik yan etkileri nedeniyle kanser tedavisinde klinik olarak etki göstermediğinde, nanoteknolojik olarak nanojeller daha etkili tedavi sağlamaktadır. Nanojeller, kolay uyarılma özellikleri ve basit mekanizmalarla farklı terapötikleri etkili bir şekilde kapsama yeteneği nedeniyle kanserin hedeflenmesi için ilaç taşıyıcı sistemler olarak araştırılmaktadır. Nanojeller hedef hücrelerin içerisine yeterince geçebilir, hedef olmayan dokularda birikmekten kaçınırlar, böylece terapötik dozu düşürürler ve zararlı yan etkileri en aza indirirler (58).

Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada iki tip yeni nanojel, Pluronic F127 misellerinin PEI (F127 / PEI nanojel) ve Pluronic F127 misellerine (F127 / PBCA nanojel) giren bir poli(butilsiyanoakrilat) ağının çapraz bağlanması kullanılarak hazırlanmıştır. Çözünürlüğü düşük olan antikanser ilaçlar, paklitaksel ve 10-hidroksikamptotesin, model ilaçlar olarak kullanılmış ve nanojellere dahil edilmiştir. Elde edilen nanojeller, polimer matrisinde homojen olarak dağıtılmış ilaç ile pürüzsüz ve belirgin bir küresel şekildedir. Nanojeller monodispers boyut dağılımı ve 200 nm'den daha az ortalama bir çapa sahip olmuştur. Seyreltme ile nanojel stabilitesi, misellerin çapraz bağlanması yoluyla geliştirilmiştir. Sitotoksite testi sonuçları, ilaç taşıyıcı sistem olarak nanojellerin kullanıldığı zaman, ilaçların *in vitro* antikanser aktivitesinin iyileştirilebileceği sonucuna varılmıştır. İlaçların nanojellere dahil edilmesi ile daha stabil, daha iyi çözünürlük ve daha iyi hücresel alım sağlanmaktadır. Bu da serbest ilacın kullanımına kıyasla daha büyük avantajlar sağlamaktadır (59).

Wang Y. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sığır serum albümin (BSA) ve kitosan bazlı nanojel formülasyonu, basit bir kendiliğinden oluşum tekniği ile hazırlanmıştır ve doksorubisin hidrokloride (DOX) için bir ilaç taşıyıcı sistem olarak etkinliği, mide kanseri hücreleri ile değerlendirilmiştir. Hazırlanan formülasyon %46.3'lük bir ilaç tutma randımanı ile 350 nm'nin altında bir boyut aralığı göstermiştir. Bu boyut aralığı, kanser ilacı dağıtımında EPR etkisi yoluyla pasif hedefleme için uygundur. DOX-BSA-CS NP'lerinin hücresel alımı, NSA'ların endositoz yoluyla hücresel girişine bağlı olabilen, SGC7901 hücrelerinde 12 saatte DOX alımının arttığını göstermiştir. Sitotoksite deneyleri hazırlanan DOX-BSA-CS'nin hücre ölümüne neden olduğunu gösterdi. Bu sonuç, SGC7901 kanser hücrelerinde yüksek oranda DOX yüklü nanojel alımı ile gerçekleşmiştir. Nanotaşıyıcılar, endositozla kanser hücrelerine girebilmektedir, bu da ilacın sürekli salımına ve daha sonra kanser hücrelerin ilaca sürekli olarak maruz kalmasına neden olmuştur. Bu ön çalışmalar, BSA-CS nanojellerinin kanser ilacı için umut verici bir ilaç taşıyıcısı olarak potansiyelini kanıtlamıştır (75).

1.3.5.2. Oligosakkaritler, Peptid ve Protein Uygulamaları

Günümüzde, terapötik proteinler keşfedilmiş olup malign, viral ve otoimmün hastalık gibi bazı spesifik hastalıklarda büyük ilgi görmüştür. Stabilitede yaşanan problemler, raf ömrü ve diğer pek çok dezavantaj, protein ilaçlarının uygulanmasını sınırlandırmaktadır. Protein, yarı ömrünü *in vivo* olarak moleküler ağırlığını arttırarak kısmen uzatabilmektedir. Çok yönlü bir ilaç uygulaması olan nanojeller, bu problemleri, proteinleri kovalent olmayan şekilde kapsülleyerek çözebilmektedir. Proteinleri nanojellere kapsüllemek için genellikle iki yol vardır: difüzyon yolu ve *in-situ* yolu. Difüzyon yolu, nanojellerle spesifik etkileşimler yoluyla proteinlerin nanojel oluşumundan sonra tutulduğu anlamına gelir. Bununla birlikte, güçlü etkileşimler, etkileşimlerin düşük kapsülleme verimliliğine yol açarken yüklerin denatürasyonuna neden olabilir. Diğer şekilde ise protein, yüksek kapsülleme verimliliği ve homojen dağılımın elde edilebildiği, nanojel formülasyon süreci sırasında *in-situ* kapsülendir. Ancak *in-situ* kapsülleme, proteinlerin aktivitesini korumak için daha kolay nanojel hazırlama koşullarına ihtiyaç duymaktadır (63). Bu nedenle, bazı yeni yaklaşımların etkili olduğu bildirilmiştir. Örneğin, J.P. Rolland ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, polimer makromonomerlerin templatasyonu ile yumuşak litografi şablonu yöntemi geliştirmiş ve polimerik misellerin çapraz

bağlanması yaygın olarak kullanılmıştır (76). Yayoi Ozawa, monobispers ve stabil nanojelleri, kısmen kolesterol ile sübstitüe edilmiş yüksek dallı siklik dekstrin türevlerinin (CH-CDex) kendiliğinden birleşmesiyle hazırlamışlardır. Bu, oluşum ilerlemesi sırasında 10–16 molekül insülini, kendiliğinden hücre içine çekebilmektedir (77). Masako Fujioka-Kobayashi ve arkadaşları kemik defektine iki farklı proteini (BMP2, FGF18) başarıyla vermişlerdir ve kendi doğal formlarında sürekli salım elde ettiler (78).

1.3.5.3. Aşı Uygulamaları

Nanojeller, CD4+, CD8+ ve T hücresi bağışıklığına dayanan hücre içi immüniteyi sağlamanın yanı sıra, uzun süreli ve güçlü bağışıklığı indüklemeye etkili olan yeni taşıyıcı sistemlerden biridir (79). Temmerman ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ovalbumin yüklü nanojel partiküllerinin çözünür proteinlere kıyasla *in vitro* CD4+, CD8+ ve T hücrelerinde etkili bir şekilde aktive olduğunu bildirilmiştir (80).

1.3.5.4. Gen Terapisi

Spesifik mRNA dizilerinin hedeflenmiş inhibisyonunda kullanılan antisens oligodeoksinükleotitlerin (ODNler), plazmid DNA (pDNA), siRNA'lar ve mikro RNA'lann (miRNA'lar) sağlanması için tasarlanan gen terapisi, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve viral enfeksiyonlar gibi birçok hastalığı tedavi etmek ve teşhis etmek için en ümit verici yöntemlerden biri olarak ortaya çıkmıştır. Nanojeller, nükleik asit veya genetik materyaller ile karıştırılarak, elektrostatik etkileşimler yoluyla lipopleksler ve polipleksler olarak komplekslerin oluşumunu sağlayarak, nükleik asitlerin hücrelere transfeksiyonunu ve fizyolojik koşullar altında stabilitelerini arttırabilen spesifik hedefleme biyo molekülleriyle konjuge edilebilmektedir (58,81)

1.3.5.5. Otoimmün Hastalıklar Tedavisi

Look ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, immünosupresan mikofenolik asit (MPA) için yeni bir nanojel ilaç taşıyıcı sistemi tasarlanmış ve denenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, antijen sunan hücreleri hedeflediği, lupus eritematozus için nanojel bazlı lokal ilaç uygulamasının daha iyi bir etkinliği olduğu sonucuna varılmıştır. Bu yeni ilaç verme sistemi hastanın uzun ömürlü olmasını sağlamakta,

böbrek hasarının başlamasını ve lupusun ortak bir komplikasyonunun gecikmesini sağlamaktadır (82).

1.3.5.6. Oftalmik Uygulamalar

Yapılan bir çalışmada pH'a duyarlı polivinil pirolidon - poli (akrilik asit) (PVP / PAAc) nanojelleri γ -radyasyon kaynaklı polimerizasyon ile hazırlanmıştır. Pilokarpinin, uzun bir süre boyunca gözde kalmasını sağlayarak etkili pilokarpin konsantrasyonunu korumak ve kapsüllemek için kullanılır (83).

1.3.5.7. Diyabet Tedavisi

Wu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, inorganik organik çekirdek yapıları hibrid nanojeller, fizyolojik pH ve yüksel sıcaklıkta hassasiyet ve seçicilik ile gelişmiş glukoz duyarlı bir formülasyon tasarlanmıştır. Bu akıllı hibrit nanojel glukoz sensörlerinin ve nanoparçacık tabanlı insülin taşıyıcı sistemlerin diğer örneklerinden farkı, nanojelin glukozu saptaması ve kendi kendini düzenleyen insülin iletiminin sağlanmasıdır. Kimyasal reaktifler ve geliştirilen hibrit nanojeller, hücrelerde toksik etkili değildir. Floresansın işlevselliği, vücut içindeki inorganik taşıyıcıların dağılımının non-invazif takibine izin verebilir. Çok fonksiyonlu hibrid nanojeller, diyabet yönetiminde *in vivo* hayvan modellerinin ve gelecekteki klinik deneylerin yanı sıra, tek bir glukoz konsantrasyonu ölçümü için yeni bir etkin model vaat etmektedir. Yapılan bu çalışmada, biyomedikal ile ilgili alanlarda çok büyük bir potansiyele sahip çok işlevsel nanomateriyallerin üretilmesi için iyi bir başlangıç noktası olabileceği düşünülmektedir (84).

1.3.5.8. Vajinal Uygulamalar

Vajinal nanojel içeren antibakteriyel ilaçlar çeşitli vajinal enfeksiyonları önlemek için kullanılmıştır. Ayrıca vajinal tahriş, akıntı ve diğer cinsel sorunları azaltmak için de kullanılabilirler. Vajinal nanojelin bazı dezavantajları sebebiyle, adet dönemi ve hamilelikte kontrendikedir. HIV profilaksisinde tenofovir vajinal jel araştırılmıştır. Tenofovirin jelatin nanopartikülleri iki aşamalı desolvasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. HPMC, biyoadeziv bir polimer olarak kullanıldığı gibi jelleştirici bir madde olarak da kullanılmıştır. Araştırmacılar, antiretroviral ilaçlara sahip belirli vajinal nanojellerin, kadınlarda HIV enfeksiyonu riskini azaltabileceğini bulmuşlardır (60,85).

1.3.5.9. Antiinflamatuvar Ajan Uygulamaları

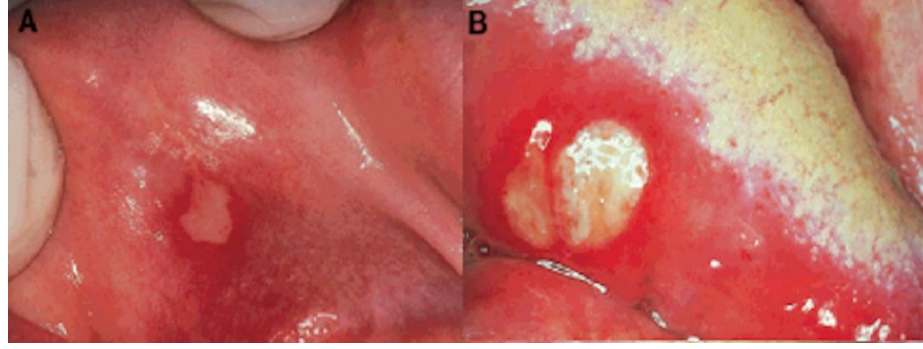
Goel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada nanojel formülasyonu hazırlamak için 3-asetil-11-keto- β -bosvellikasit (AKBA) ve AKBA yüklü nanopartiküller kullanıldı. Nanojeli hazırlamak için istenen viskoziteye Carbopol kullanılarak ulaşılmıştır. Enflamasyon tedavisi için AKBA yüklü nanopartiküller kullanıldı. AKBA nanojelinin *in vivo* anti-inflamatuvar aktivitesi, AKBA jeli eşdeğer konsantrasyona göre çok daha yüksekti. Bu, polimerik nanopartiküllerin ultra küçük boyutunun yanı sıra mukoadhezifliğine de bağlanabilmektedir. *In vivo* verilerden, geliştirilen nanojelin transdermal ilaç iletimi için büyük bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılabilmektedir (86).

1.4. ORAL ÜLSER

Oral ülserler; travma, aftöz stomatit ve liken planus likenoid reaksiyonları, sitotoksik terapi (radyasyon ve kemoterapi gibi) mukozanın ilaç kaynaklı hipersensitivite reaksiyonları ve malign değişiklikler gibi epitelyal hasarın bir sonucudur (87).

Oral ülserler, oral mukozayı etkileyen en sık rastlanan durumlardan biridir. Oral mukoza ağrılı ülserasyona duyarlıdır. Akut oral ülserler tek veya çoklu olabilmektedir. Lamina propria'nın doku kuvvetleri nedeniyle oval bir şekil oluşturma eğilimindedir. Ülser yatağı, yara iyileşmesi sürecinde sarımsı bir fibromembranöz tabakası ile kaplıdır. Ülser yatağı kaplandığında ağrı azalır. Akut oral ülserler kısa sürelidir ve birkaç gün ile birkaç hafta sürmektedir. Uzun süreler boyunca devam eden ülserler kronik olarak adlandırılmaktadır (88).

Oral ülserler sıklıkla çok ağrılıdır ve enfeksiyon riskini artırırken beslenme ve ağız hijyenine zarar verir. Klinik olarak, birçok hastada ağız mukozasında tekrarlayan, spesifik olmayan stomatitten oral ülserin bir formu olarak görülmektedir.



Şekil 4. A. minor oral ülser, B. major oral ülser lezyonları (89).

1.4.1. Oral ülser nedenleri

Oral ülserlerin oluşmasında bireysel ve çevresel faktörler etkili olmaktadır (90).

Bireysel Faktörler

- Cinsiyet ve yaş
- Hormonal değişiklik
- Yiyecek duyarlılığı
- İlaçlar
- Kansızlık
- Çinko eksiliği

Çevresel Faktörler

- Stress
- Lokal travma
- Tütün ürünleri

1.4.2. Ağız içinde görülen ülseratif hastalıklar

1.4.2.1. Rekürrent Aftöz Stomatit (RAS)

Rekürrent aftöz stomatit (RAS), oral ülserasyonun en sık görülen biçimidir ve genel popülasyonda görülme sıklığı % 5 ila % 60 arasında değişmektedir. Sağlıklı bir

bireyde tekrarlayan oral mukozal ülserasyonla karakterize edilen bu hastalık, yetişkinlerde ve hastanın ömrü boyunca cinsiyete bağlı olmaksızın devam edebilir (91). İlaçların topikal uygulaması, RAS gibi ülseratif ve inflamatuvar mukozal hastalıkların tedavisi için tercih edilmektedir (24).

Oral aftlar çaplarına göre 3 grupta incelenirler:

- Minör aft;** RAS'ın en yaygın formu olup, genellikle 5 ila 19 yaş arasındaki hastalarda görülür. Aftlar 1 cm'den küçük, gri membran ve eritemli halo eşliğinde birkaç, yüzeysel, yuvarlak ülserasyon ile karakterizedir. Minör aft, genellikle dudaklarda, dilde ve bukkal mukozada sınırlıdır (92).

- Major aft;** çapı genellikle 1-3 cm olan derin ve sert bir şekilde oluşur. 10 gün ila 6 hafta arasında veya bazen daha da uzun sürebilir. Tekrarlayan benign oral ülserlerin yaklaşık% 10'unu oluştururlar. Yaklaşık % 64'ü iz bırakarak iyileşirler (93).

- Herpetiform aft;** klinik olarak birbirinden farklı, 1-2 mm arasında ağız mukozasında dağılmış çok sayıda ülser kümesi olarak görülürler. Adı benzemesine rağmen bu lezyonların herpes simplex virüsü ile ilişkisi yoktur (94).

1.4.2.2. Sekonder Oral Ülserasyonları

Liken Planus

Liken planus, nüfusun %1 ila % 2'sini etkileyen yaygın bir mukokutanöz hastalıktır. Lezyonlar en sık hem oral hem de kutanöz yüzeylerde (%40), bunu takiben tek başına kutanöz yüzeyde (%35) ve tek başına mukozada (%25) görülür. Oral liken planus, genellikle 30 ila 70 yaş arası erkeklerde ve kadınlarda görülür. Çocuklar ve ergenler nadiren etkilenirler (95).

Behçet Hastalığı

Behçet hastalığı, 1937'de bir Türk dermatolog Hulusi Behçet (1889-1948) tarafından "tekrarlayan oral aftöz ülser, genital ülser ve hipopirobe" olarak tanımlanmıştır. Oral ve genital aftlar, kutanöz lezyonlar, oküler, gastrointestinal, nörolojik tutulum ve artrit de dahil olmak üzere değişken klinik belirtilerle karakterize, kronik, tekrarlayan sistemik bir hastalıktır (96).

Multiform Eritem

Diş ortamında multiform eritem görülebilir ve akut başlangıç durumunda teşhis ve bakıma ihtiyacı vardır. Bu akut bağışıklık bozukluğu, ağız boşluğu da dahil cilt ve/veya mukoz zarları etkiler. Oral mukozal lezyonlar, multiform eritem olgularının % 70'inden fazlasında görülür. Oral mukozal ülserasyonları ile birlikte cilt lezyonu az veya hiç yoktur. Başlangıçta veziküller veya büller de mevcut olabilir. Yanak mukozası, damak ve dil gibi ağızdaki herhangi bir alanı etkileyebilir. Çoğu durumda, dudakların hemorajik kabuğunu gösteren dudak lezyonları gözlenir. Konuşmayı, yemek yemeyi ve sıvı alımını engelleyen hafif ila şiddetli ağız ve perioral ağrı olabilir. Dudak ve ağız lezyonları yara izi olmaksızın iyileşir (97).

Çölyak Hastalığı

Çölyak hastalığı veya glütene duyarlı enteropati olarak da bilinen Çölyak lapaları, ince bağırsağın glutene karşı tahammülsüzlüğüyle ilgili bir durumdur. Gluten ve onun bileşen bileşiği gliadin, buğday, çavdar, yulaf ve arpa ürünlerinde her yerde bulunan yüksek moleküler ağırlıklı peptitlerdir (98).

Oral Kandidiazis

Oral kandidiazis, tanısı ve tedavisi yapıldığında iyi bir tedaviye sahip sık görülen bir dermatolojik durumdur. İki formu bulunmaktadır: beyaz oral kandidiyazis veya eritematöz oral kandidiyazis. Beyaz oral kalliyazis iki alt tip içerir: psödomembranöz kandidiyaz ve hiperplastik kandidiyaz. Antifungal tedavi ile birlikte iyi ağız hijyeninin sağlanması hastalığı önlemek ve etkili bir şekilde tedavi etmek için çok önemlidir. Tıbbi tedavi için birçok seçenek vardır. Hastalığın yaygınlığına ve şiddetine göre ilaçların ve ilaç etkileşimlerinin olası yan etkileri dikkate alarak uygun bir tedavi seçeneği seçebilmektedir (99).

1.4.3. Tedavi

1.4.3.1. Topikal Tedavi

Oral ülser tedavisine başlarken ilk olarak topikal ilaçlar ile başlamak daha sonra tekrarlama oranını ve salgının şiddetini azaltmak amacıyla gerektiğinde

sistemik ilaç tedavisi ve daha sonra lazer uygulamak uygun olmaktadır. Farklı mekanizmalara sahip birkaç topikal ilaç RAS lezyonlarının tedavisinde etkilidir. Topikal tedavi, süperenfeksiyonun önlenmesi, mevcut ülserlerin korunması, analjezi, iltihaplanmayı azaltma ve aktif ülserlerin tedavisini amaçlar. (92)

Topikal uygulamalar (100)

- Anestezikler
- Koruyucu biyoadesivler
- Kortikosteroidler
- Antimikrobiyal ağız suları
- Lokal koterizasyon
- Sukralfat
- Amiloglukozidaz
- Glukoz oksidaz

1.4.3.2. Sistemik Tedavi

Oral ülser tedavileri normalde topikal tedavilerle çözülür, ancak bazı durumlarda lezyonların ciddiyeti veya bilinmeyen nedenlerden dolayı bu önlemlerin yetersiz olduğu kanıtlanmıştır. En etkili tedaviler arasında kortikosteroidler ve bağışıklık baskılayıcılar bulunur. Pentoksifilin, kolşisin, dapson ve talidomid de kullanılmıştır, ancak olası olumsuz etkiler nedeniyle dikkatli olmak gerekir. Hiçbiri kalıcı hastalık telafisini güvence altına alamadığından, bu tedaviler aslında hafifleticidir. Kortikosteroidler sistemik tedavinin ilk tercihidir. Genellikle akut şiddetli RAS salgınlı hastalarda kurtarma tedavisi olarak kullanılırlar (101)

Sistemik ajanlar (100)

- Kolşisin
- Dapson
- Pentoksifilin
- Levamisole
- Sistemik kortikosteroidler
- Azathioprin
- Methotreksat

- Siklosporin A
- Klorambusil
- Siklofosfamid
- Infliksimab
- Etanercept
- Interferon A
- Talidomid

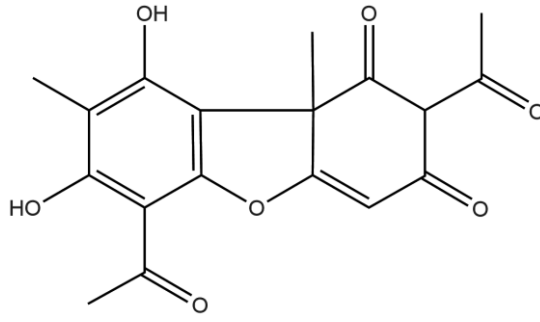
1.5. USNİK ASİT

Usnik asit (UA) ilk olarak 1844'te Knop tarafından tanımlanmış ve 1948'de antibakteriyel aktivitesi gösterilmiştir. Usnik asit; tüberküloz tedavisinde, analjezik ve antipiretik olarak, yaralarda, mikozlarda, boğaz ağrısında, diş ağrısı ve çeşitli cilt enfeksiyonlarının tedavisinde yüzyıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (102).

Antimikrobiyal ajan ve antibiyotik olan usnik asit, gram-pozitif bakterilere ve mikobakterilere karşı aktiviteye sahiptir, ancak planktonik gram-negatif bakterilere ve mantarlara karşı etkin değildir (103). Usnik asit güçlü bir antioksidandır ve büyük ölçüde dermatolojik ve kozmetik ürünlerde koruyucu olarak kullanılır. (+)-Usnik asit likenlerin *Usnea* veya *Ramalina* türlerinden % 26'ya varan oranlarda kolayca izole edilebilir ve ticari olarak temin edilebilir. Saf bir bileşik olarak kremler, diş macunu, ağız gargarası, deodorantlar, antibiyotik merhemler ve güneş koruyucu ürünlerin içeriğinde yer almaktadır. *Usnea barbata* ekstreleri, usnik asit ve yardımcı tuzu antimikrobiyal preparatlar olarak formüle edilmiştir. Çoğu preparatta, hem aktif madde hem de koruyucu madde olarak usnik asit kullanılmaktadır (104).

1.5.1. Fiziksel Özellikler

Usnik asit (UA), birçok liken türü tarafından üretilen sarımtırak bir pigmenttir. 9b pozisyonunda bulunan metil grubunun yönlenişindeki farklılıktan olan iki enantiyomeri bulunur (Şekil 4). UA'nın 25°C'de sudaki çözünürlüğü 0.01 mg / ml'den daha düşüktür. (105,106). Sudaki düşük çözünürlüğü nedeniyle, usnik asit kullanımı ağız bakımı, topikal merhemleri ve kozmetik formülasyonlar ile sınırlıdır.



Şekil 5. Usnik asidin yapısı.

Kapalı formülü: C₁₈H₁₆O₇

Kimyasal adı: [2,6-diasetil-7,9-dihidroksi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandione]

Molekül ağırlığı: 344,315 g/mol

Erime noktası: 204 °C

CAS no: 125-46-2

1.5.2. Farmakolojik Özellikler ve Etki Mekanizması

Usnik asitin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri farmakoloji ve kliniklerde potansiyel bir uygulamaya sahiptir. Bunun nedeni, usnik asidin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral ve antiinflamatuvar, antiprotozoal, antiproliferatif ve analjezik etkinliğe sahip olmasıdır. Çoğu araştırmada, usnik asit, gram pozitif bakterilere ve ilaç dirençli bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip bir antibiyotik olarak kabul edilmektedir (107,108).

UA'nın etki mekanizması halen bilinmemektedir. Bununla birlikte, deneysel bulgular, antiviral etkisinin RNA transkripsiyonunu inhibe etmesinden kaynaklandığını göstermiştir (103).

UA'ların ilk aktivitesi farelerde akciğer kanserine ve P388 lösemisine karşı bildirilmiştir (109). Daha fazla usnik asitin insan kanser hücre dizileri üzerinde antimitotik etkiler gösterdiği ve lösemi, akciğer ve göğüs kanseri hücrelerinde kanser

hücrelerinin kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, UA'ya maruziyet p53'ü aktive etmez ve DNA hasarına sebep olduğu ileri sürülmemiştir (110,111).

(+) Usnik asidin farmakokinetiği Krishna ve Venkataramana (1992) tarafından ilk kez bir tavşan modelinde intravenöz ve oral uygulama sonrası incelenmiştir. Ölçülen usnik asit plazma seviyeleri, intravenöz veya oral tedavilerin, M. tuberculosis'in *in vitro* büyümesini inhibe ettiği bilinen konsantrasyon seviyesinin çok üzerinde olduğunu göstermiştir (105).

Usnik asit toksisitesi ile ilgili veriler ağırlıklı olarak, kilo vermeyi teşvik etmek için usnik asit içeren preparatların sistemik kullanımı ile ilgilidir.

Usnea türleri veya saflaştırılmış usnik asit, dünya çapında çeşitli ürünlerde kullanılan bileşenlerdir. Örneğin, liken özü ve saflaştırılmış usnik asit, parfümeri, kozmetik, güneş kremi ve kişisel hijyende kullanılan diş macunu, gargara, şampuan ve deodorant gibi ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Almanya'da "Omnigran A, Granobil ve Usnagren A" ticari markaları altında kozmetik ve ilaçta usnik asit formülasyonları kullanılmıştır. Finlandiya'da "ramalina thrausta", boğaz ağrısını ve diş ağrısını tedavi etmek için dahili olarak ve yaraları ve atlet ayağını tedavi etmek için harici olarak kullanılmıştır. İtalya'da, vajinal kremlerde, ayak kremlerinde, tozlarda ve şampuanda usnik asit kullanılmıştır. Arjantin'de Barba del la Piedra" (Usnea densirostra) birçok rahatsızlığı tedavi etmek için kullanılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Usnea bitkisel tozlardan veya birkaç bitkisel tedarik şirketlerinden kurutulmuş liken olarak elde edilebilmektedir. Elde edilen Usnea diyet takviyesi olarak mağazalarda tek başına ya da Echinacea gibi bitkiler ile kombinasyon halinde alkol veya alkol içermeyen preparatlarda çözelti şeklinde yaygın olarak bulunmaktadır (112).

BÖLÜM II

DENEYSEL BÖLÜM

ÇALIŞMANIN GENEL PLANI

Çalışmamızda ilk olarak usnik asitin karakterizasyon çalışmaları yapılacaktır. Usnik asitin UV spektrumu analizi ve FTIR analizi yapılarak etkin maddenin saflığına bakılacaktır. Etkin madde HPLC çalışmaları yapılarak, kalibrasyon eğrisi çizilecek ve oluşturulan metot valide edilecektir. Ön formülasyon çalışmalarında 3 farklı nanojel hazırlama yöntemi kullanılacaktır. Bunlar; yüksek sıcaklıklarda asidik pH'da kitosan ve BSA (sığır serum albumin) nanojellerinin oluşturulması yöntemi, iyonik jelleşme yöntemi ve kitosan β -gliserol fosfat nanojelleridir. Hazırlanan formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için partikül boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, viskozite, pH gibi karakterizasyon çalışmaları yapılacak ve elde edilen sonuçlara göre optimum formülasyonlar seçilecektir. Seçilen nanojel formülasyonlarına etkin maddemiz olan usnik asit yüklenecek ve bu formülasyonların da karakterizasyon çalışmaları yapılacaktır. Hazırlanan formülasyonun antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilecektir. pH 6.8 tampon çözeltisinde etkin maddenin formülasyonlardan *in vitro* salımı incelenecektir. Daha sonra inek ağız mukozası kullanarak *ex vivo* permeasyon ve penetrasyon çalışmaları ve biyoadezyon çalışması yapılacaktır. Nanojel formülasyonlarının fiziksel stabilitesini incelemek ve geliştirilen en uygun usnik asit yüklü nanojel formülasyonunun, tavşanların ağız içi ülseratif yara bölgesine uygulanacak ve tedavi süreci histopatolojik olarak değerlendirilecektir.

2. GEREÇ YÖNTEM

2.1 Kullanılan Kimyasal Madde Araç ve Gereçler

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik Asit.....	Sigma-Aldrich-Almanya
Aseton.....	Sigma-Aldrich-Almanya
β -Gliserol Fosfat.....	Sigma-Aldrich-Almanya
Bovine Serum Albumin.....	Sigma-Aldrich-Almanya
Kitosan (Çeşitleri).....	Sigma-Aldrich-Almanya
Metanol.....	Sigma-Aldrich-Almanya
N-Oktanöl.....	Merck - Almanya
Sodyum Tripolifosfat (TPP)	Sigma-Aldrich-Almanya
Usnik Asit.....	Sigma-Aldrich-Almanya
Karboksi Metil Selüloz (CMC).....	Sigma-Aldrich-Almanya

2.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

Buzdolabı	Miele – Almanya
Etüv.....	Ecocell – Almanya
Diyaliz membranı.....	Spectra/Por – Amerika
Hassas terazi	Ohaus – Almanya
HPLC.....	HPAgilent1100Series-Almanya
IR spektrometre	Perkinelmer- Türkiye
Karıştırıcı.....	Heidolph- Almanya
Manyetik ısıtıcı karıştırıcı	Heidoph - Almanya

Partikül boyutu ölçüm aleti.....	Malvern ZetaSizer,Nano ZS - İngiltere
pH Metre.....	İnolab WTW Series – Almanya
Refraktometre.....	Kruss-DR301-95-Almanya
Reometre.....	Haake Mars, plate PP35 Ti, plate cover MPC35, Karlsruhe, Almanya
Santrifüj cihazı.....	Eppendorf 3414–Almanya
Su banyosu.....	Buchi 461 – Türkiye
Texture Analyzer.....	TAXT Plus
Ultrasonik banyo.....	Bandelin Sonorex-Almanya
UV spektrofotometre.....	Shimadzu UV 1201
Viskozimetre.....	SV-10 AND Vibro- Japonya
Vortex.....	VWR Mixer-Amerika

2.2 Yöntem ve Deneyler

2.2.1 UA'nın Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1 UA'nın Infrared (IR) Analizi

UA etkin maddesi IR spektrofotometre cihazı kristalinin üzerine konuldu ve UA'nın IR spektrofotometre cihazında $4000-400\text{ cm}^{-1}$ arasında taranıp pik verdiği dalga boyları tespit edildi.

2.2.1.2 UA'nın Ultraviyole (UV) Analizi

Kuvartz küvetler kullanılarak etkin maddeye ait ultraviyole spektrumu alındı ve maksimum absorbands verdiği dalga boyu saptandı.

2.2.1.3 UA'nın Lipid/Su Partisyon Katsayısı Tayini

UA'nın lipid/su partisyon katsayısının tayini için, n-oktanol fazı distile su ile deneyden 24 saat önce doyuruldu. Distile su ile UA'nın $4 \times 10^{-4}\text{ M}$ çözeltisi hazırlanarak ve başlangıçtaki UA konsantrasyonu HPLC ile tayin edildi. Bu

çözeltilinin 2 mL'si 10 mL'lik tüpe alınarak üzerine 2 mL organik faz eklendi. Tüplerin ağzı kapatılarak 24 saat oda sıcaklığında yatay çalkalayıcı ile çalkalandı ve ardından 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra sulu fazdaki UA konsantrasyonu HPLC ile tayin edildi. n-Oktanoldaki UA konsantrasyonu (yağda çözünen etkin madde), sulu fazdaki başlangıç ve son konsantrasyon arasındaki fark hesaplanarak bulundu. UA'nın lipid/su partisyon katsayısı Eşitlik 3 ile hesaplandı. UA'nın lipid/su partisyon katsayısı 6 paralel örnek ile çalışılarak hesaplandı. Her örnek HPLC ile 3 kere ölçülerek değerlendirildi.

$$\text{Eşitlik 3 : } \log P = \log [M_n/M_s]$$

M_n = n-oktanolde çözünen etkin madde miktarı

M_s = sulu fazda çözünen etkin madde miktarı

2.2.1.4 Etkin Maddenin Çözünürlük Tayini

Çözünürlük çalışmasında doygunluk elde etmek için UA'nın aşırısı kullanılarak 1 mL distile suda, etanolde, asetonda, pH 6.8 tampon çözeltisinde ve *in vitro* salım ortamı için kullanılan pH 6.8 tamponu / aseton (%70/%30) karışımında süspende edildi. Çözünen UA miktarları belirlenmeden önce, çözünmemiş UA'nın uzaklaştırılması için hazırlanan karışımlar 15.000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Üstte kalan berrak sıvı kısım alınıp, 0.45 µm filtreden süzüldü. Elde edilen süzüntüler gerekli seyreltmeler yapılarak HPLC ile miktar tayini yapıldı.

2.2.2 UA'nın Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

2.2.2.1. Analitik Yöntem Geliştirme

UA etkin maddesi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) analitik yöntemi geliştirildi. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözgenler ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisi için hazırlanan standartların derişimleri 0.75 µg/mL, 1.0 µg/mL, 1.5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5.0 µg/mL ve 7.5 ve 10.0 µg/mL'dir. HPLC metodunun validasyonunda dayanıklılık ve stabilite, doğruluk ve geri elde edilebilirlik doğrusallık, kesinlik, tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik, günler arası geçerlilik parametreleri değerlendirildi.

2.2.2.2 HPLC mobil fazın hazırlanması

Kullanılan HPLC sistemi UV lamba, otomatik örnekleyici, degaz ünitesi ve kolon fırınından oluşmaktadır (Agilent 1100-1200 serisi). Analizler için C18 (ACE, 5 µm, 250x4.6 mm) kolon kullanıldı. Mobil faz için Metanol ve %1'lik Asetik Asit çözeltisi (90:10) kullanılarak hazırlandı. Çözelti 0,2 µm çapında membrandan süzülüp, kullanıldı. 20 µL örnek 1 mL/dk akış hızında sisteme enjekte edildi. Dalga boyu olarak 2.2.1.2'de yapılan çalışmalar sonucunda maksimum absorbansın alındığı 240 nm kullanıldı.

UA etkin maddesi için geliştirilen bu yöntemin güvenilirliğinin belirlenmesi için validasyon çalışmaları yapıldı.

2.2.2.3 Validasyon Çalışmaları

Analitik validasyonun kabul edilebilirliğini sağlayan validasyon parametreleri aşağıda gösterildi:

- Dayanıklılık, Stabilité (Stability)
- Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik (Accuracy and Recovery)
- Doğrusallık (Linearity)
- Kesinlik (Precision)
 - ✓ Tekrar edilebilirlik (repeatability)
 - ✓ Tekrar elde edilebilirlik (reproducibility)
- Özgünlük, Seçicilik (Specificity)

2.2.2.3.1. Doğrusallık

Standart eğrinin çizimi için 100 mg UA 100 mL asetonda çözündürüldü, böylece stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden 0.75 µg/mL, 1.0 µg/mL, 1.5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5.0 µg/mL ve 7.5 ve 10.0 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde mobil fazla seyreltilen örnekler beş paralel olarak incelendi. Her enjeksiyondan sonra bulunan alan değeri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi. Doğrunun eşitliği ve r^2 değeri hesaplandı.

In vitro ve *ex vivo* çalışmalarında kullanılmak üzere 1 mg UA asetonda çözündürülerek hazırlanan stok çözeltiden 0.75 µg/mL, 1.0 µg/mL, 1.5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5.0 µg/mL ve 7.5 ve 10.0 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde pH 6,8 tampon çözeltisi ile seyreltilen örnekler beş paralel olarak incelendi. Her

enjeksiyondan sonra bulunan alan değeri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi. Doğrunun eşitliği ve determinasyon katsayısı (R^2) değeri hesaplandı. Standart çözeltilerin HPLC de alıkonma zamanında ve maksimum absorpsiyon elde edilen her bir konsantrasyona ait pik alanı hesaplandı. UA derişimine karşı pik alanları grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon eşitliği saptandı. Her ölçüm 5 defa tekrarlandı.

2.2.2.3.2. Kesinlik

İstatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda olmak üzere aynı konsantrasyondaki örnekler ölçülerek aritmetik ortalama, standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısının (VK) hesaplanmasıyla gerçekleştirilir. VK'nın % 2'den küçük olması yöntemin kesinliğinin sağlandığını ifade eder. Buna göre aynı konsantrasyondaki (10 µg/mL) standart çözelti, ardarda on kez ölçülerek ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

2.2.2.3.2.1. Tekrar Edilebilirlik

Kalibrasyon eşitliği oluşturmak için hazırlanan stok çözeltisinden bir konsantrasyon (10 µg/mL) seçilmiş ve iki farklı günde hazırlanan bu konsantrasyondaki çözeltiler HPLC de altı kez okundu. Alan değerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı. Varyasyon katsayısının % 2'den az olması yöntemin tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir.

2.2.2.3.2.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik için aynı stoktan hareket edilerek seyreltmeyle hazırlanan on adet aynı konsantrasyondaki (10 µg/mL) çözeltinin alan değerleri 2 farklı analist tarafından test edildi ve elde edilen değerlerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplandı. Bulunan varyasyon katsayısının % 2'den küçük olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir.

2.2.2.3.3. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır. Bu hesaplamada yöntemin doğruluğu % geri kazanım değerlerinin ortalaması hesaplanarak, onaylanır. Standart sapma (SS) veya varyasyon katsayısı (VK) ile ifade edilir. Üç farklı konsantrasyonda

(2,5, 5 ve 10 µg/mL) üç paralel örneğin alan değerleri ölçülmüştür. Alan değerine karşılık gelen konsantrasyon miktarı kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak bulundu. Bulunan değerden yüzde geri kazanımları Eşitlik 2 yardımı ile hesaplandı.

Eşitlik 4. % Geri Kazanım = $(K_{pratik} / K_{teorik}) \times 100$

K_{pratik} : Etkin maddelerin kalibrasyon eşitliğinden elde edilen konsantrasyon değeri

K_{teorik} : Etkin maddenin konsantrasyon değeri

2.2.3. UA'nın Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini

MİK (Minimum Inhibitory Concentration) testi gram negatif E. Coli, gram pozitif metisiline duyarlı S. aureus, ile CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmalar, Mueller Hinton II Agar besiyerinde 37°C'de 17 saatlik inkübasyon sonrasında turbidite 0.5 McFarland'a eşdeğer olacak şekilde steril tuz çözeltisinde (% 0.85) süspansiyon edilmiştir. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun belirlenmesi için 96 kuyucuklu microplate'ler kullanılmıştır. Her kuyucuğa 100 µL steril Mueller Hinton II Broth (Becton Dickinson and Company, France), 100 µL mikroorganizma süspansiyonu ve hazırlanan UA konsantrasyonlarından 100 µL aktarılmış ve microplate'ler 37°C 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra kuyucuklarda oluşan bulanıklık gözlenmiştir.

2.2.4. Formülasyon Çalışmaları

Nanojel formülasyonları yüksek sıcakta asidik pH'da, iyonik jelleşme yöntemi gibi farklı yöntemler denenerek hazırlandı.

2.2.4.1. Yüksek Sıcaklıkta Asidik pH'da Nanojel Formülasyonlarının Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmalarında optimum nanojel formülasyonlarının geliştirilmesi için yüksek sıcaklıkta asidik pH'da kitosan ve sığır serum albümin (BSA) kullanılarak nanojel formülasyonları oluşturuldu. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda (75,113) farklı oranlarda CS/BSA ile 7 adet formülasyon, 3 farklı molekül ağırlığındaki (düşük, orta, yüksek molekül ağırlığı) kitosanla denenmek üzere toplam

21 adet formülasyon hazırlandı. CS, asetik asit çözeltisi içerisinde çözündürülerek 1 gece boyunca şişirildi. CS/BSA ağırlık oranı istenen oranda olacak şekilde hesaplama yapıldı ve gerekli miktarda BSA'nın çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan BSA çözeltisi kitosan çözeltisinin içerisine damla damla eklenerek oda sıcaklığında yüksek hızda 1 saat karıştırıldı. Karışım daha sonra 1 saat boyunca 80°C ye ayarlanan su banyosunda yüksek hızda karıştırıldı. Ardından 1 M NaOH çözeltisi ile istenen pH'ya ayarlanan formülasyonlar yarım saat daha karıştırılmaya bırakıldı. Hazırlanan her formülasyon farklı molekül ağırlığındaki (düşük, orta, yüksek) kitosan türleri ile denendi (Tablo 2.).

Tablo 2. Yüksek sıcaklıkta asidik pH'da hazırlanan nanojel formülasyonları

Formülasyon Kodu	CS (%)	BSA (%)	CS Türü	CS:BSA	Asetik Asit (%)	pH
F1	0.75	0.02	Düşük MA	1:5	1	5.4
F2	0.75	0.02	Orta MA	1:5	1	5.4
F3	0.75	0.02	Yüksek MA	1:5	1	5.4
F4	0.5	0.5	Düşük MA	1:4	0.75	5.95
F5	0.5	0.5	Orta MA	1:4	0.75	5.95
F6	0.5	0.5	Yüksek MA	1:4	0.75	5.95
F7	0.75	0.02	Düşük MA	13:10	1	5.4
F8	0.75	0.02	Orta MA	13:10	1	5.4
F9	0.75	0.02	Yüksek MA	13:10	1	5.4
F10	0.5	0.5	Düşük MA	1:6	0.75	5.95
F11	0.5	0.5	Orta MA	1:6	0.75	5.95
F12	0.5	0.5	Yüksek MA	1:6	0.75	5.95
F13	0.5	0.5	Düşük MA	1:5	1	5.95
F14	0.5	0.5	Orta MA	1:5	1	5.95
F15	0.5	0.5	Yüksek MA	1:5	1	5.95
F16	0.75	0.02	Düşük MA	1:4	1	5.95

F17	0.75	0.02	Orta MA	1:4	1	5.95
F18	0.75	0.02	Yüksek MA	1:4	1	5.95
F19	0.75	0.02	Düşük MA	1:6	1	5.95
F20	0.75	0.02	Orta MA	1:6	1	5.95
F21	0.75	0.02	Yüksek MA	1:6	1	5.95

2.2.4.2. İyonik Jelleşme Yöntemi ile Kitosan/TPP Nanojel Formülasyonlarının Hazırlanması

%0,2 oranında farklı molekül ağırlığındaki kitosan çözeltisi, %1’lik asetik asit çözeltisi ile hazırlanarak 1 gece boyunca şişirildi. %0,2 oranında Sodyum Tripolifosfat (TPP) tartılıp distile suda çözündürüldü. TPP çözeltisi istenen oranda kitosan çözeltisi içerisine damla damla ilave edilmiş ve 1 saat boyunca güçlü bir şekilde karıştırıldı.

Tablo 3. İyonik jelleşme yöntemi ile hazırlanan nanojel formülasyonları

Formülasyon Kodu	CS (%)	TPP (%)	CS Türü	CS:TPP	Asetik Asit (%)
F22	0.2	0.2	Düşük MA	1:1	1
F23	0.2	0.2	Orta MA	1:1	1
F24	0.2	0.2	Yüksek MA	1:1	1
F25	0.2	0.2	Düşük MA	2:1	1
F26	0.2	0.2	Orta MA	2:1	1
F27	0.2	0.2	Yüksek MA	2:1	1
F28	0.2	0.2	Düşük MA	3:1	1
F29	0.2	0.2	Orta MA	3:1	1
F30	0.2	0.2	Yüksek MA	3:1	1
F31	0.2	0.2	Düşük MA	4:1	1
F32	0.2	0.2	Orta MA	4:1	1
F33	0.2	0.2	Yüksek MA	4:1	1

2.2.4.3. CS / β -Gliserol Fosfat Nanojel Formülasyonlarının Hazırlanması

200 mg kitosan tartılıp %1 asetik asit çözeltisi (9 ml) ile bir gece boyunca karıştırıldı. Hazırlanan kitosan çözeltisi (%2.22 a/h) daha sonra buz banyosunda 4°C'ye soğutuldu. β -gliserol fosfat %56 a/h oranında distile su ile hazırlanıp 4°C'ye soğutuldu. Hazırlanan β -GF çözeltisi (1 ml) kitosan çözeltisinin (7 ml) içerisine güçlü bir karıştırma ile damla damla ilave edildi. Karışım 10 dakika karıştırıldı.

Tablo 4. Kitosan β -gliserol fosfat nanojel formülasyonları

Formülasyon Kodu	CS (%)	β -GF (%)	CS Türü	CS:GF	Asetik Asit (%)
F34	2.22	56	Düşük MA	7:1	1
F35	2.22	56	Orta MA	7:1	1

Nanojel formülasyonları hazırlandıktan sonra viskozitesini arttırmak amacıyla %4 karboksi metil selüloz (CMC) ilave edildi.

2.2.5. Nanojel Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi Çalışmaları

Hazırlanan nanojel formülasyonlarında optimum olanların seçimi formülasyonların fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ile yapıldı. Hazırlanan nanojel formülasyonları ile yapılan karakterizasyon sonuçlarına göre partikül boyutu ve PDI si düşük olan formülasyonlar optimum olarak seçildi.

Seçilen formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini belirlemek, formülasyon hazırlama aşamalarından gelebilecek olumsuzlukları ve etkin madde ile taşıyıcılar arasındaki etkileşim ve geçimsizlikleri saptamak amacıyla bir seri analiz yapılmıştır: formülasyonların fiziksel görüntüsü, pH değeri, elektriksel iletkenliği, kırılma indisi, damlacık boyutu dağılımı, zeta potansiyeli ve içerik miktarları belirlenmiştir.

2.2.5.1 Formülasyonların Fiziksel Görünüşü

UA içeren ve içermeyen taze hazırlanmış formülasyonların oda sıcaklığında ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) fiziksel görünüşleri incelenerek değerlendirilmiştir. Dijital olarak fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.5.2 Formülasyonların Partikül/Damlacık Büyüklüğünün Saptanması

UA içeren/içermeyen formülasyonların partikül/damlacık büyüklükleri Malvern Zeta Sizer Nano ZS aletini kullanarak 173° 'lik bir açıyla, oda sıcaklığında ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ölçülmüştür. Her örnekten 5 deneme yapılmış ve her deneme 5 kez tekrar edildi.

2.2.5.3 Formülasyonların Zeta Potansiyelinin Saptanması

UA içeren/içermeyen seçilen formülasyonların zeta potansiyelleri 78.5 dielektrik sabitinde, Malvern Zeta Sizer Nano ZS ile $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ölçülmüştür. Her örnekten 5 deneme yapıldı ve her deneme 5 kez tekrar edildi.

2.2.5.4 Formülasyonların pH Ölçümleri

UA içeren / içermeyen formülasyonların pH değeri oda sıcaklığında pH-metre (Inolab WTW Series) ile ölçüldü. Ölçüm için 2 g formülasyon 8 g distile su ile karıştırılarak seyreltildi ve pH metre ile pH ölçümü gerçekleştirildi.

2.2.5.5 Formülasyonların Kırılma İndisi Ölçümü

UA içeren / içermeyen formülasyonların kırılma indisi ölçümü refraktometre (Atago RX-7000 CX) ile yapıldı.

2.2.5.6 Optimum Formülasyonlara Etkin Madde Yüklenmesi

Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda optimum olarak seçilen formülasyonlara etkin madde 0,5 mg/mL konsantrasyonunda ilave edildi (114). UA'nın MİK değerlerinin seçilen konsantrasyondan düşük olmasına dikkat edildi.

2.2.5.7 İçerik Miktar Tayini

Seçilen formülasyonlardan 1 g alınarak 10 mL aseton içerisinde çözündürülmüştür. HPLC hareketli fazı ile gerekli seyreltmeler yapıldı ve UA

miktarı HPLC kullanılarak belirlendi. Deney 6 kez tekrarlandı. Ayrıca her enjeksiyon 3 kez tekrarlandı.

2.2.5.8 AFM ile Yapılan Morfolojik Analiz Çalışmaları

Nanojel formülasyonlarının morfolojik özellikleri, bir Pico Plus (Molecular Imaging, Tempe, AZ) ticari enstrümanı kullanılarak atomik kuvvet mikroskobu (AFM) yoluyla yapıldı. Topografi görüntüleri aralıklı mod, 48 N/m'lik bir yay sabiti ve 190 kHz'lik bir frekansa sahip sil-simgе problemleri kullanılarak elde edildi. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

2.2.6. Optimum Formülasyonların Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Nanojel formülasyonları reometre cihazı (Haake Mars, plate PP35 Ti, plate cover MPC35, Karlsruhe, Almanya) kullanılarak reolojik açıdan incelendi. Çalışmalar, 20 mm çapındaki çelik prob, 0.3 mm sabit aralık kullanılarak yapıldı. Hazırlanan formülasyonların elastik modül (G'), viskoz modül (G''), dinamik viskozite (η') ve faz açısı ($\tan \delta$) tayin edildi.

2.2.8. *In Vitro* Salım Çalışmaları

UA içeren nanojel formülasyonlarının *in vitro* salım çalışmaları için diyaliz membran kullanıldı. 0.5 mg/mL konsantrasyonunda UA içeren nanojel formülasyonlarından 1 mL diyaliz membranın içerisine koyulup diyaliz membranın uç kısımları kapatıcı ile kapatıldı. %70 pH 6.8 tampon çözeltisi, %30 aseton içeren 100 mL çözelti beher içerisinde hazırlanıp çoklu ısıtıcı üzerine kondu. 37 ± 1 °C sıcaklıkta ve 150 rpm ye ayarlanan çoklu ısıtıcı karıştırıcı üzerine yerleştirilen çözelti içerisine diyaliz membranlar kondu. *In vitro* salım çalışmasında salım ortamından 30.dk, 1., 2., 3., 4., 5., 6., 8., 10., 12. ve 24. saatte 1 ml örnek alındı ve HPLC viallerine konuldu. Örnek alındıktan sonra ortama 1 ml %70 pH 6.8 tamponu ve %30 aseton ile hazırlanan çözelti eklendi. Alınan örnekler HPLC'de değerlendirildi ve ortamdaki UA konsantrasyonu tespit edildi. Nanojel formülasyonlarının *in vitro* salım çalışmaları her bir formülasyon için dört paralelle gerçekleştirildi.



Şekil 6. *In vitro* salım çalışması

2.2.9. *Ex vivo* Çalışmalar

2.2.9.1. Permeasyon ve Penetrasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmalarına göre optimum olarak seçilen F10, F13 ve F28 kodlu biyoadeziv nanojel formülasyonları, *ex vivo* difüzyon çalışmaları için mezbahadan taze olarak alınan inek bukkal mukozası kullanıldı.

Difüzyon çalışmalarının tamamı difüzyon hücresi kullanılarak $37\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 'de ve 600 devir/dk hızda gerçekleştirildi. Sığır bukkal mukozası difüzyon hücresine monte edildi. Hücrelerin akseptör kısmı 5 mL pH 6.8 tampon çözeltisi reseptör fazına dolduruldu. Optimum nanojel formülasyonları ise 1.3 cm çaplı formülasyon donör kısma konuldu. Difüzyon hücreleri buharlaşmayı önlemek için parafilm ile ve tüm sistemin etrafı alüminyum folyo ile kapatıldı. Reseptör fazdan belirli zaman aralıklarında (0.5, 1., 2., 3., 4., 5., 6., 8., 10., 12. ve 24. saat) 1 mL örnek alınarak HPLC ile eğri altı alanları ve standart denklem kullanılarak konsantrasyonları belirlendi. Her örnek alımından sonra yerine aynı ısıya getirilmiş taze reseptör faz konularak çalışma sürdürüldü.

2.2.9.2. Optimum Formülasyonların *Ex vivo* Biyoadezyon Özelliklerinin Ölçülmesi

Ex vivo biyoadezyon testi için Texture Analyzer cihazı kullanıldı (Şekil 7). Nanojellerin *ex vivo* biyoadezif özellikleri, doku analizör probunun altındaki platforma çift taraflı bantla yapıştırılan inek bukkal dokusu (100 µL tampon çözeltisi ile nemlendirilmiş) üzerinde değerlendirildi. Testler 37 ± 0.5 ° C'de gerçekleştirildi. Bukal mukozayı taşıyan prob 0.5 mm s⁻¹ sabit hızda inerek jelin yüzeyine temas etmesi sağlanır. Başlangıç temas kuvveti (0.5 N) altında 60 saniye temas süresi tutulduktan sonra, iki yüzey 0.5 mm s⁻¹ sabit hızda ayrıldı. Yer değiştirmenin bir fonksiyonu olarak maksimum ayırma kuvveti (F max), doğrudan Doku Üssü yazılımından kaydedildi, µJ'de ifade edilen mukoadhezyon işi, kuvvete karşı mesafe eğrisinin altındaki alandan hesaplandı. Her deney altı kez gerçekleştirildi.



Şekil 7. Texture Analyzer cihazı görüntüsü

Test parametreleri

Prob Test öncesi probun hız	: P 20 aluminium (2 mm çap)
Test esnasında probun hızı	: 0.5 mm/saniye
Test sonrası probun hızı	: 0.5 mm/saniye
Probun geri dönüş mesafesi	: 0.5 mm/saniye
Jel ile bukkal mukozanın temas süresi	: 60 saniye
Jel ile bukkal mukozanın ilk temas kuvveti	: 0.5 N

Jel ile bukkal mukozanın teması süresince uygulanan kuvvet : 0.5 N

Bu parametreler kullanılarak F10 ve F13 formülasyonlarının ex vivo biyoadezyon testi yapıldı.

2.2.10. Stabilité Çalışmaları

Optimum formülasyonlar, 4°C’de buzdolabında, 25°C’de oda koşullarında %60 rölâtif nem ve 40°C’de %75 rölâtif nem içeren stabilite kabininde, 3 farklı koşulda 12 ay boyunca değerlendirildi. Belli zaman aralıklarında (1., 2., 3., 4., 5., 6., 9. ve 12. aylarda) formülasyonlarda yapılan karakterizasyon çalışmalarında kullanılan parametreler (partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel, pH, viskozite) ve etkin madde miktar tayini yapıldı. Her formülasyon için üç paralel ile çalışıldı. Geliştirilen formülasyonlarından stabilitesi en yüksek olan formülasyon optimum formülasyon olarak seçilerek çalışmalara bu formülasyon ile devam edildi.

2.2.11. In Vitro Antibakteriyal Etkinlik Tayini

Kuyu Difüzyon Testi

Kuyu difüzyon (Well Difüzyon) testi gram-pozitif *B. cereus* kullanarak yapılmıştır. Mikroorganizmalar bulanıklık 0.5 McFarland’a eşdeğer olacak şekilde steril fizyolojik tuzlu su ile süspande edilmiştir. McFarland standartları, bir sıvı besiyerinde bulunan bakteri sayısını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. McFarland'ın baryum klorür ve sülfirik asit kullanarak geliştirdiği standart bulanıklık tüpleri, sıvı bir besiyerine ekilen bakterinin miktarına eşdeğer bulanıklık derecelerini

içerir. Kuyu difüzyon yöntemi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan süspansiyonlardan 100 µL alınarak steril Mueller Hinton II Agar (Becton Dickinson and Company, France) petri yüzeyine steril Drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Daha sonra agar üzerine aseptik koşullarda (Class II laminar hava kabinlerinde) 6 mm çapında steril kuyular açılmış ve her bir kuyuya 100 µl formülasyon pipetlendi. Petriler 37°C’ de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra oluşan inhibisyon zonu ölçülmüştür. Deney 3 defa tekrarlamıştır. Bu çalışmada kullanılan gruplar aşağıda verilmiştir.

Grup 1: Usnik asit içeren F13 formülasyonu

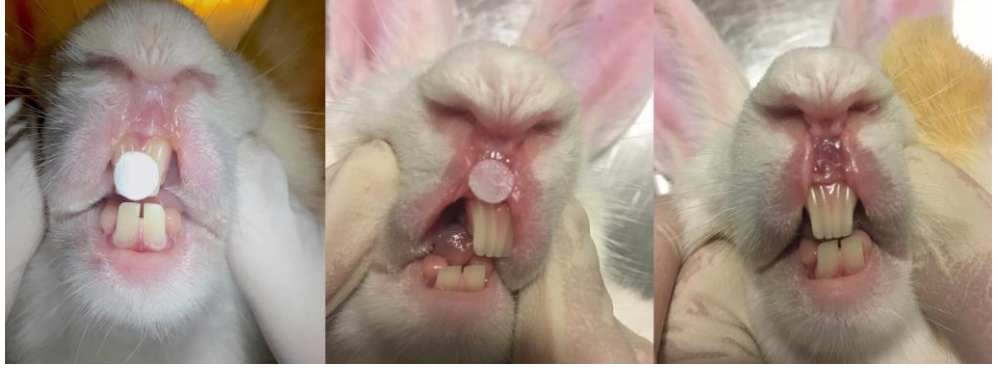
Grup 2: Usnik asidin süspansiyonu

Grup 3: %25 DMSO

2.2.12. In Vivo Çalışmalar

Yapılan karakterizasyon, *in vitro* ve *ex vivo* çalışmaların sonucunda belirlenen optimum nanojel formülasyonu *in vivo* çalışmalarda kullanıldı. Bu çalışmalarda etkin maddenin ve biyoadeziv taşıyıcı nanojelin yara iyileşmesindeki etkisinin araştırılması amacıyla, etkin madde içeren nanojel formülasyonu, etkin madde içermeyen nanojel formülasyonu ve kontrol grubu olarak serum fizyolojik deney hayvanlarına uygulandı.

Çalışmada diş eti üzerinde oral ülser modeli oluşturmak için, 2.5-3.0 kg ağırlığında olan toplam 21 adet genç erkek Yeni Zelanda tavşanları kullanıldı. Anestezi altındaki (ketamin hidroklorür 35 mg/kg, ksilazin 5 mg/kg) tavşanlarda aseptik doku nekrozuna neden olmak için, çapı 6 mm olan yuvarlak bir filtre kağıdı, 15 µL % 50 asetik asit içine batırılarak kullanıldı. Yuvarlak ülserler oluşturmak için, asit batırılmış kağıt, tavşanların labiyal gingival dokusuna 60 saniye preslendi. Ülser başlangıcından 24 saat sonra günde 2 kere tedaviye başlandı. Birinci grup sadece aktif madde içermeyen nanojel ile tedavi edilecek; ikinci grup, UA içeren nanojel ile muamele edilecek; ve üçüncü gruba serum fizyolojik uygulandı. Nanojel ülseratif bölgeye iğne olmadan bir şırınga yardımıyla uygulandı (Karavana et al., 2012).



Şekil 8. Oral ülser modelinin oluşturulması.

Uygulanacak dozun ayarlaması usnik asitin tedavide kullanılan miktarının tavşanların ağırlığına göre hesaplanması ile yapıldı. Tavşanların labial gingivasında meydana getirilen oral ülser alanının büyüklüğü, 0.5 g jelin uygulanmasına imkan verdiği için, hesaplı miktarda etkin maddeyi içeren 0.5 g jel günde iki defa olacak şekilde 1. gruptaki hayvanlara uygulandı.

2. Gruptaki hayvanlara günde iki defa sadece usnik asit içermeyen nanojel uygulandı. Uygulama etkin madde içeren nanojelle aynı şekilde yapıldı.

3. Gruptaki hayvanlarla ise kontrol grubu oluşturulur ve bu gruptaki hayvanlara herhangi bir tedavi edici özelliği olmayan serum fizyolojik uygulandı.

2.2.13. Histopatolojik Çalışmalar

Deney hayvanları 12. günün sonunda yüksek doz anestezik madde (pentobarbital 100 mg/kg) ile sakrifiye edilerek ülser oluşturulan mukoza çıkartılacak ve dokuların fiksasyonları sağlandı. Dokulardan 5 µm kalınlıkta kesitler alınacak ve kesitler hematoxylin-eosin (HE) ile boyandı.

Histopatolojik skorelama kör olarak gerçekleştirildi ve birden çok lezyonun aynı tavşana olması durumunda skorların ortalaması alındı. Histopatolojik skorelama daha önce gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda kullanılan metod ile yapıldı (116). Mukozal bölge, epidermal ve dermal rejenerasyon, granülasyon dokusunun oluşumu

(fibroblast proliferasyonu ve kollajen rekonstrüksiyonu) ve mukozal bölgede yeniden damar yapısının oluşumu incelendi.



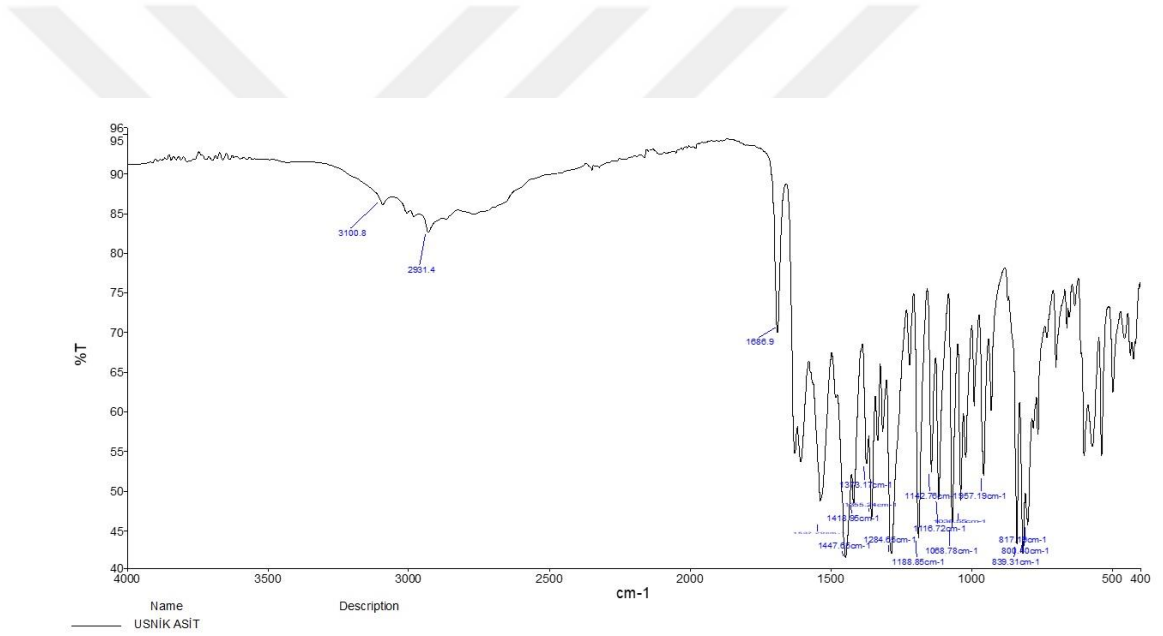
BÖLÜM III

3. BULGULAR

3.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

3.1.1 UA'nın Infrared (IR) Analizi

UA'nın IR analizi Bölüm 2.2.1.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Şekil 9'da elde edilen sonuç bulunmaktadır.



Şekil 9. UA'ya ait IR spektrumu.

3.1.2 UA'nın Ultraviyole (UV) Analizi

UA'nın UV analizi Bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı gibi literatürde yazan dalga boyları denenerek 240 nm olarak bulundu.

3.1.3 UA'nın Lipid/Su Partisyon Katsayısı Tayini

Bölüm 2.2.1.3'de anlatıldığı gibi UA'nın Lipid/Su Partisyon Katsayısı Tayini yapıldı. Sonuç -0.256 olarak bulundu.

3.1.4. UA'nın Çözünürlük Deneyi Bulguları

Bölüm 2.2.1.4'de anlatıldığı gibi UA'nın çözünürlük çalışmaları gerçekleştirildi. Distile su, etanol, aseton, pH 6.8 tampon çözeltisi ve *in vitro* salım ortamı için kullanılması amacıyla pH 6.8 tamponu / aseton (%70/%30) karışımında çözünürlük deneyi gerçekleştirildi. Çözünürlük sonuçları Tablo 5'de yer almaktadır.

Tablo 5. UA'nın çözünürlük çalışması sonuçları

Çözücü Ortamı	Çözünürlük (mg/mL)
Distile Su	0.048 ± 0.006
Etanol	0.278 ± 0.001
Aseton	4.514 ± 0.148
pH 6.8 tampon	0.028 ± 0.001
Aseton/pH 6.8 tampon (%30/%70)	0.628 ± 0.016

Elde edilen sonuçlara göre UA'nın asetondaki çözünürlüğünün diğer çözücü ortamlarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle mobil faz hazırlamada ve *in vitro* salım çalışmalarında sink koşulu sağlamak amacıyla aseton kullanıldı.

3.2 HPLC Yöntem Validasyonu Bulguları

3.2.1 Doğrusallık Bulguları

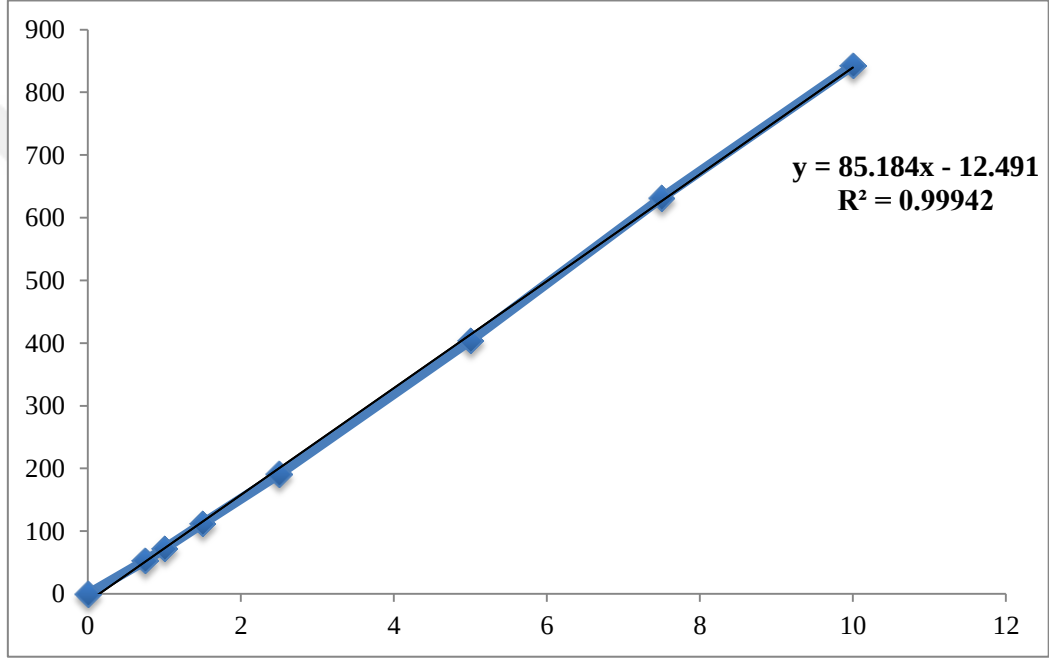
Bölüm II, Yöntem 2.2.2.3.1'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Sonuçlara göre çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 10'da gösterildi. R^2 değeri 0.99942 olarak bulundu.

Kalibrasyon eğrisi çiziminde oluşan piklerden her nokta için 5 değerin ortalaması kullanılmış, her örnek 5 kez okundu.

Y: HPLC ile elde edilen pik alanı

X: Konsantrasyon (ppm) ($\mu\text{g/mL}$)

R^2 : Determinasyon katsayısı



Şekil 10. UA'nın 240 nm dalga boyunda pH 6.8 tamponunda çizilen kalibrasyon eğrisi

3.2.2 Kesinlik Bulguları

Bölüm II, Yöntem 2.2.2.3.2'de anlatıldığı gibi çalışıldı. 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu hazırlanmış on kez art arda HPLC'de okutulması sonucu elde edilen alan değerleri Tablo 6'da gösterildi. Bu alan değerlerinin varyasyon katsayısı (VK) % 2'den düşük bulundu.

Tablo 6. UA'nın hazırlanan standart çözeltisinin HPLC ile çizilen kalibrasyon eğrisine ait kesinlik bulguları

Örnek No	Alan Değeri
1	830.1
2	830.4
3	828.4
4	833.1
5	832.3
6	831.3
7	834.1
8	832.6
9	830
10	830.5
11	833.9
12	829.5
ORT	831.35
SP	1.827
% VK	0.220

3.2.2.1. Tekrar edilebilirlik sonuçları

Tekrar edilebilirlik çalışması bölüm 2.2.2.3.2.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Bir gün arayla 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan örnekler HPLC de okutulmuştur. 1. gün ve 2. gün sonuçları sonuçları Tablo 7'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların VK'nın %2'den küçük olduğu görülmüştür.

Tablo 7. HPLC validasyon çalışmaları tekrar edilebilirlik sonuçları: 1. ve 2. gün

Örnek No	1. Gün Alan	2. Gün Alan
	Değeri	Değeri
1	842.4	842.9
2	840.5	840.8
3	839.2	838.6
4	838.9	835
5	843.5	838.3
6	841.9	838.8
7	842.2	839.8
8	845.3	842
9	837.3	844.5
ORT	841.738	840.078
SP	2.155	2.841
% VK	0.256	0.338

3.2.2.2. Tekrar Elde Edilebilirlik Bulguları

Bölüm II, Yöntem 2.2.2.3.2.2’de anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Aynı konsantrasyonda on iki farklı örneğin 2 farklı analist tarafından hazırlanıp cihaza verilmesi sonucu elde edilen alan değerleri Tablo 8’de gösterilmiştir. Varyasyon katsayısının % 2’den az olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 8. HPLC validasyon çalışmaları tekrar elde edilebilirlik bulguları

Örnek No	1. Analist	2. Analist
	(Alan Değeri)	(Alan Değeri)
1	831.200	839.600
2	839.500	842.200
3	831.350	841.033
4	834.500	844.200

5	822.900	843.200
6	839.850	842.467
7	839.050	845.667
8	835.250	845.467
9	835.800	846.867
10	835.550	845.267
11	837.100	847.367
12	838.450	848.067
ORT	835.042	844.283
SP	4.785	2.630
% VK	0.573	0.312

3.2.3. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik sonuçları

Yöntemin doğruluğu için HPLC çalışmasında elde edilen alan değerlerinin % geri kazanım değerlerinin ortalaması, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar yöntemin doğruluğunu göstermiştir. Üç farklı konsantrasyonun (2.5, 5, 10 µg/mL) 5 paralelle yapılan HPLC okuma sonuçları ortalamaları, SS ve VK Tablo 6'da gösterilmiştir. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışması için 2.5, 5, 10 µg/mL konsantrasyonlarının alan değerlerinin kalibrasyon eşitliğinde karşılık geldiği µg/mL değerleri saptandı ve Tablo 9'da gösterilmiştir. % Geri kazanımları üç konsantrasyonun (5, 10, 15 µg/mL) Tablo 9'da gösterilmiştir, geri kazanım değerlerinin ortalaması, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. VK değeri 2'nin altında bulunmuştur.

Tablo 9. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik bulguları

C	Alan	Bulunan C	Geli Elde
(ppm)	Değerleri	(ppm)	(%)
2,5	189.967	2.377	95.068
2,5	189.133	2.367	94.677
2,5	189.683	2.373	94.935
		ORT	94.894
		SP	0.162
		% VK	0.171
5	403.183	4.880	97.594
5	402.850	4.876	97.516
5	403.767	4.887	97.731
		ORT	97.614
		SP	0.089
		% VK	0.091
10	836.283	9.964	99.640
10	836.400	9.965	99.654
10	838.483	9.990	99.898
		ORT	99.731
		SP	0.119
		% VK	0.119

3.3. UA'nın Minumum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini

Etkin madde olarak kullanılan UA'nın minimum inhibisyon konsantrasyonu 2.2.3.'de anlatıldığı gibi tayin edildi. Tablo 10'da sonuçlar gösterildi. Etkin maddemizin piyasada bulunan ve oral ülser tedavisinde kullanılan referans bir preparatı bulunmadığı için MİK tayini ile elde edilen sonuçlar etkin maddenin formülasyon içerisindeki konsantrasyonunu belirlememizde ve bu değer minimum inhibisyon değerinden yüksek olmasına dikkat edildi.

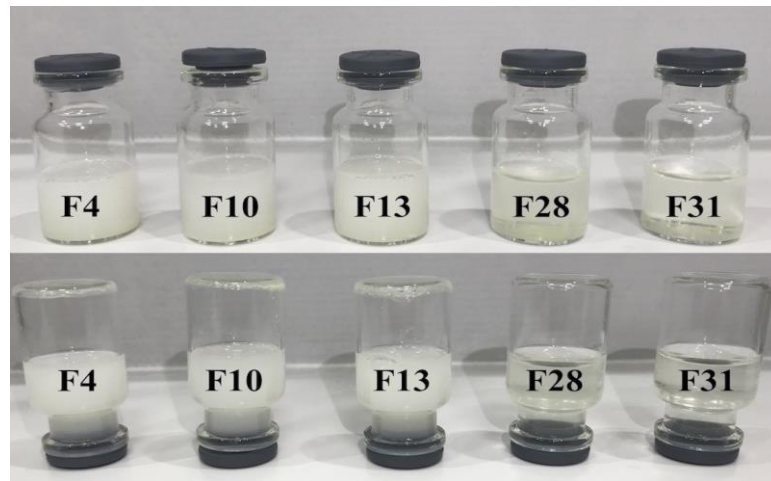
Tablo 10. UA'nın MİK sonuçları

Bakteri Adı	Bacillus cereus	Escherichia coli	Klebsiella pneumoniae	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus
UA'nın MİK değeri	0.25 µg/ml	32 µg/ml	32 µg/ml	32 µg/ml	1 µg/ml

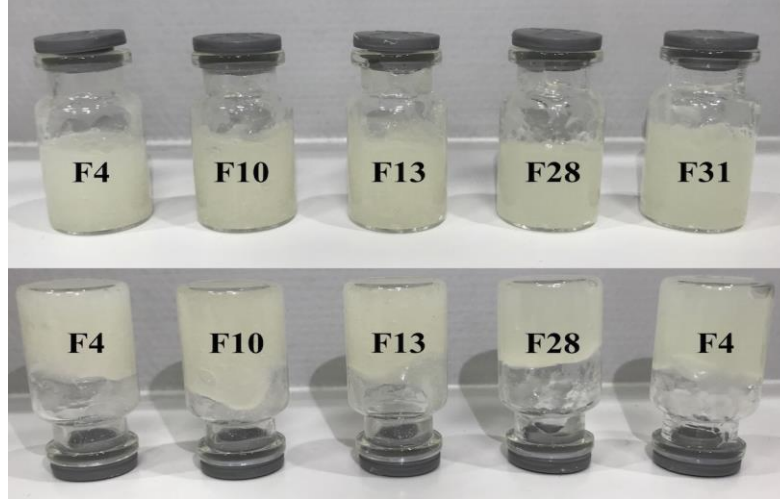
3.4. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.4.1. Optimum Formülasyonlara UA Yüklenmesi ve Fiziksel Görünüşü

UA etkin maddesinin oral ülser tedavisinde kullanımı literatürde bulunmamaktadır. Literatürde sistemik kullanımına bağlı toksik etkilerin UA'nın literatürde bulunan ve dermal olarak yara tedavisinde kullanılan dozu 0.5 mg/mL'dir. Yapılan MİK çalışmaları sonucu UA'nın ağızda bulunan bakterilere karşı etkinliği 0.5 mg/mL'den düşük olduğu için bu konsantrasyonun tedavide uygun olduğuna karar verildi. UA formülasyona eklendiğinde renginin sarı olmasından dolayı formülasyonların rengini ve görünüşünü değiştirdi. Formülasyonların görüntüleri Şekil 11 ve Şekil 12'de görülmektedir.



Şekil 11. Nanojel formülasyonlarının fiziksel görünüşü



Şekil 12. Nanojel formülasyonlarına %4 CMC a/h eklendikten sonraki görünüşü

3.4.2. Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini belirlemek üzere karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Buna göre elde edilen sonuçlar Tablo 11’de görülmektedir.

Tablo 11. Hazırlanan formülasyonların karakterizasyon sonuçları

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
F1	338.2 ± 4.941	0.201 ± 0.029	21.1 ± 0.846
F2	357.16 ± 16.516	0.632 ± 0.013	16.76 ± 1.34
F3	6048.2 ± 1755.297	1 ± 0	7.22 ± 2.096
F4	229.8 ± 7.856	0.149 ± 0.071	26.48 ± 1.447
F5	309.3 ± 32.665	0.320 ± 0.033	24.32 ± 0.818
F6	397.04 ± 22.367	0.483 ± 0.054	24.5 ± 1.660
F7	312.32 ± 2.956	0.183 ± 0.02	26.7 ± 0.210
F8	377.84 ± 9.558	0.271 ± 0.044	19.7 ± 0.283
F9	190.18 ± 4.360	0.370 ± 0.026	33.2 ± 0.684
F10	347.08 ± 7.037	0.1342 ± 0.04	19.9 ± 0.261

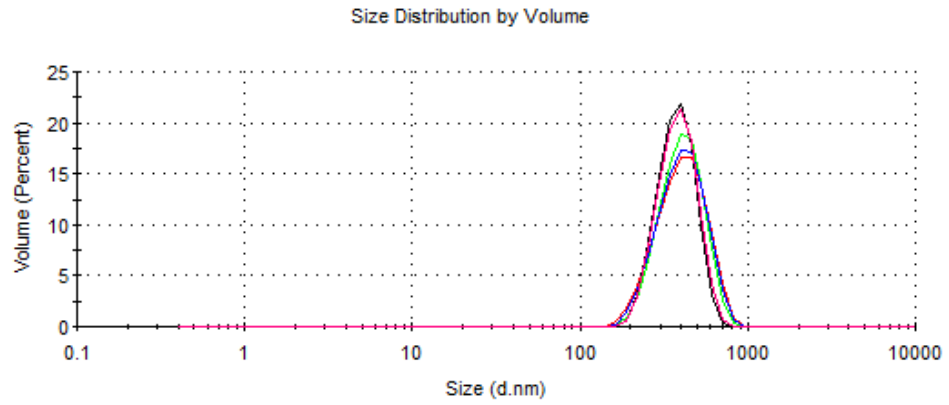
F11	426.36 ± 314.468	0.5288 ± 0.276	22.1 ± 5.014
F12	241.36 ± 54.022	0.394 ± 0.048	30.84 ± 1.744
F13	379.475 ± 211.826	0.4165 ± 0.155	21.225 ± 1.205
F14	405.84 ± 61.879	0.4436 ± 0.055	24.24 ± 0.508
F15	320.58 ± 93.143	0.4978 ± 0.125	6.92 ± 0.490
F16	284.32 ± 5.530	0.2274 ± 0.052	-36.04 ± 0.418
F17	628.66 ± 289.854	0.5496 ± 0.160	8.232 ± 0.658
F18	430.52 ± 135.264	0.4472 ± 0.124	-4.584 ± 0.561
F19	150.42 ± 38.728	0.247 ± 0.049	-9.058 ± 0.256
F20	39.728 ± 17.320	0.217 ± 0.072	-7.426 ± 0.691
F21	1939.8 ± 440.679	1 ± 0	-6.58 ± 1.205
F22	2.8512 ± 0.434	0.526 ± 0.137	2.121 ± 2.501
F23	2909.546 ± 3767.346	0.587 ± 0.366	14.54 ± 1.021
F24	4800.630 ± 3478.165	0.882 ± 0.150	10.878 ± 0.7
F25	192.96 ± 106.973	0.399 ± 0.086	0.077 ± 2.065
F26	183.06 ± 75.423	0.506 ± 0.043	-0.319 ± 2.701
F27	244.28 ± 10.544	0.517 ± 0.050	21.82 ± 0.870
F28	196.88 ± 32.037	0.452 ± 0.018	44.76 ± 1.12
F29	282.04 ± 76.534	0.409 ± 0.088	49.64 ± 1.247
F30	336.6 ± 61.796	0.611 ± 0.199	46.4 ± 1.828
F31	257.7 ± 120.586	0.388 ± 0.085	48.3 ± 0.944
F32	258.44 ± 71.683	0.344 ± 0.054	54.34 ± 2.222
F33	430.48 ± 92.397	0.951 ± 0.073	59.46 ± 1.995
F34	768.6 ± 284.948	0.658 ± 0.271	8.272 ± 0.813
F35	645.88 ± 112.082	0.553 ± 0.063	7.762 ± 1.593

3.4.2.1. Formülasyonların Partikül/Damlacık Büyüklüğünün Saptanması

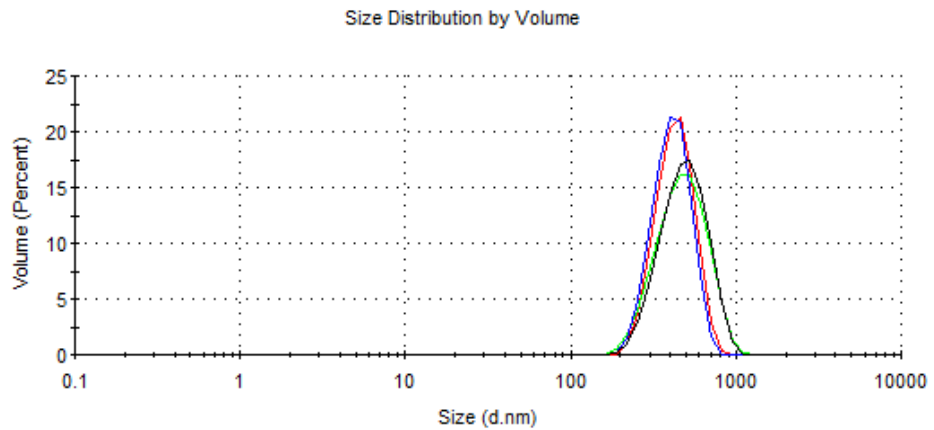
UA etkin maddesi yüklendi ve yüklenen formülasyonların partikül büyüklüğü bölüm 2.2.5.2.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Nanojellerin partikül büyüklüğü sonuçları Tablo 12'de gösterildi. Şekil 13'de UA yüklenmeyen F13 formülasyonuna ait partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 14'de ise UA yüklü F13 formülasyonuna ait partikül büyüklüğü dağılımı gösterildi.

3.4.2.2. Formülasyonların Zeta Potansiyelinin Saptanması

UA etkin maddesi yüklenen ve yüklenmeyen formülasyonların zeta potansiyeli saptanması bölüm 2.2.5.3’de anlatıldığı gibi yapıldı. Nanojellerin zeta potansiyelleri sonuçları Tablo 12’de gösterildi. Şekil 13 ve Şekil 14’de boş ve UA yüklü nanojel formülasyonuna ait partikül büyüklüğü ve dağılımı görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 13. UA yüklenmeyen F13 formülasyonuna ait partikül büyüklüğü dağılımı



Şekil 14. UA yüklenen F13 formülasyonuna ait partikül büyüklüğü dağılımı

Tablo 12. Etkin madde yüklenen ve yüklenmeyen formülasyonların partikül büyüklüğü, pdi ve zeta potansiyeli sonuçları

	Boş Formülasyonlar			Etkin Maddeli Formülasyonlar		
Formülasyon Kodu	Partikül Büyüklüğü	PDI	Zeta Potansiyeli	Partikül Büyüklüğü	PDI	Zeta Potansiyeli
F4	426.6	0.133	22.667	196.02	0.064	28.6
	±	±	±	±	±	±
	21.49	0.031	0.543	2.93	0.053	1.666
F10	390.02	0.135	18.067	475.94	0.300	18.88
	±	±	±	±	±	±
	10.24	0.066	0.419	4.392	0.051	0.356
F13	380.82	0.117	21.567	250.22	0.089	20.56
	±	±	±	±	±	±
	18.19	0.042	0.896	4.11	0.052	0.330
F28	183.3	0.422	31.1	364.22	0.428	39.14
	±	±	±	±	±	±
	34.10	0.064	0.829	66.963	0.041	0.424
F31	173.56	0.445	41.867	148.28	0.435	45.68
	±	±	±	±	±	±
	11.18	0.020	0.66	18.617	0.026	0.9

Formülasyonların viskozitesi %4 CMC ile artırıldıktan sonra partikül boyutu stabil kaldığını kontrol etmek amacıyla F13 formülasyonunun Malvern ZetaSizer ile ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlarda $314,65 \pm 4,782$ nm partikül boyutuna sahip olduğu tespit edildi.

3.4.2.3. Formülasyonların pH Ölçümleri

UA etkin maddesi yüklenen ve yüklenmeyen formülasyonların pH ölçümü bölüm 2.2.5.4’de anlatıldığı gibi yapıldı. Nanojellerin pH sonuçları Tablo.13’de gösterildi.

3.4.2.4. Formülasyonların Kırılma İndisi Ölçümü

UA etkin maddesi yüklenen ve yüklenmeyen formülasyonların kırılma indisi bölüm 2.2.5.5’de anlatıldığı gibi ölçüldü. Nanojellerin kırılma indisi sonuçları Tablo.13’de gösterildi. Kırılma indisi dataları Malvern Zeta Sizer partikül boyutu ölçümünde ön veri olarak kullanıldı.

Tablo 13. Formülasyonların viskozite, pH ve kırılma indisi sonuçları

Formülasyon Kodu	pH	Kırılma İndisi
F4	6,815 ± 0,004	1.33
F10	6,873 ± 0,003	1.33
F13	6,838 ± 0,011	1.33
F28	6,872 ± 0,005	1.33
F31	6,863 ± 0,007	1.33

3.4.2.5. İçerik Miktar Tayini

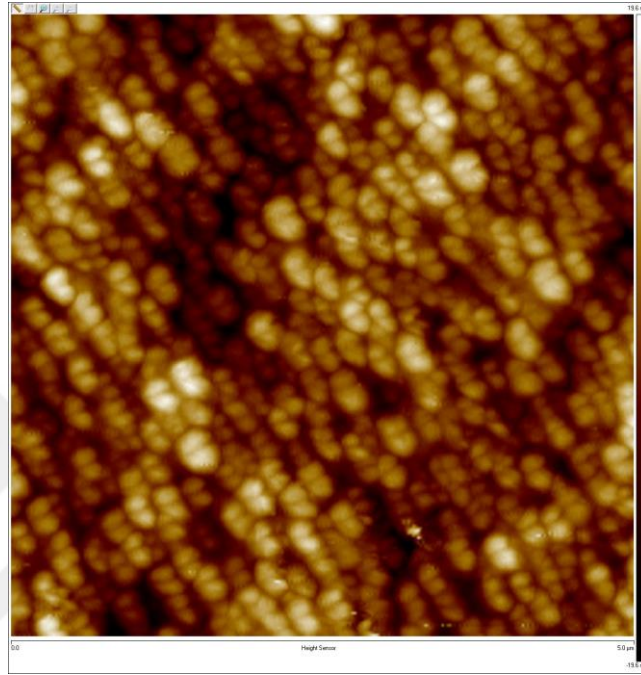
II. Bölüm, yöntem 2.2.5.7’de anlatıldığı gibi yapılan formülasyonların içerik miktar tayini testi ait bulgular Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14. İçerik miktar tayini testi ait bulgular

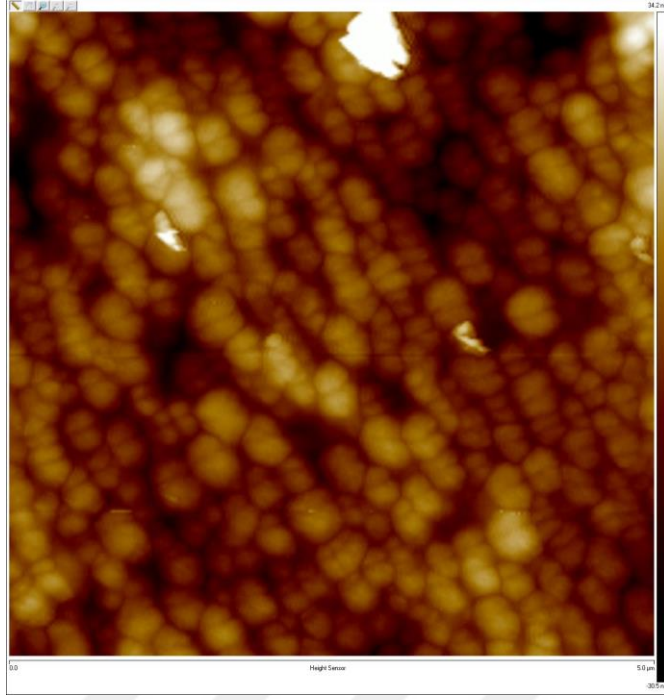
Formülasyon Kodu	Etkin Madde Miktarı (%) ± SS
F4	93.402 ± 3.242
F10	96.603 ± 4.824
F13	95.146 ± 2.427
F28	90.661 ± 0.992
F31	90.753 ± 0.052

3.4.2.6. Optimum Formülasyonların AFM ile Yapılan Morfolojik Analiz Çalışmaları

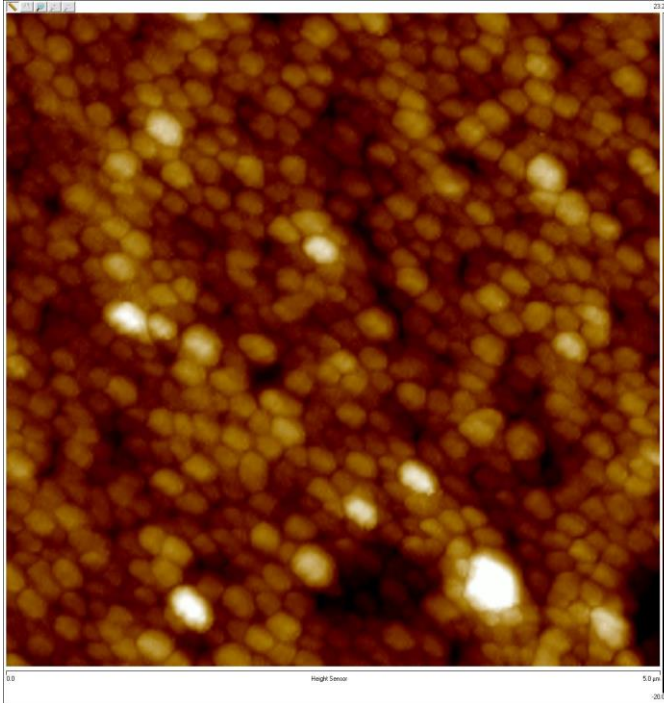
II. Bölüm, yöntem 2.2.5.8’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen, etkin madde yüklü optimum formülasyonların AFM ile görüntülenmesine ait bulgular Şekil 15-20’de verilmiştir.



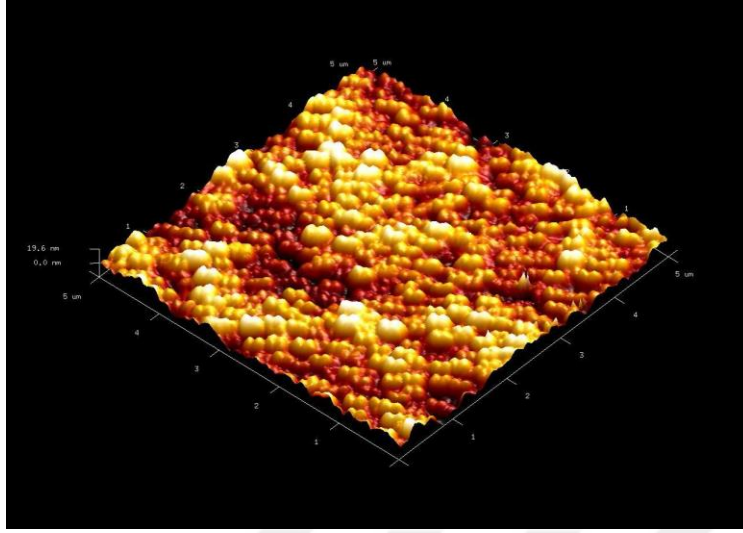
Şekil 15. F4 formülasyonuna ait 2 boyutlu AFM görüntüsü



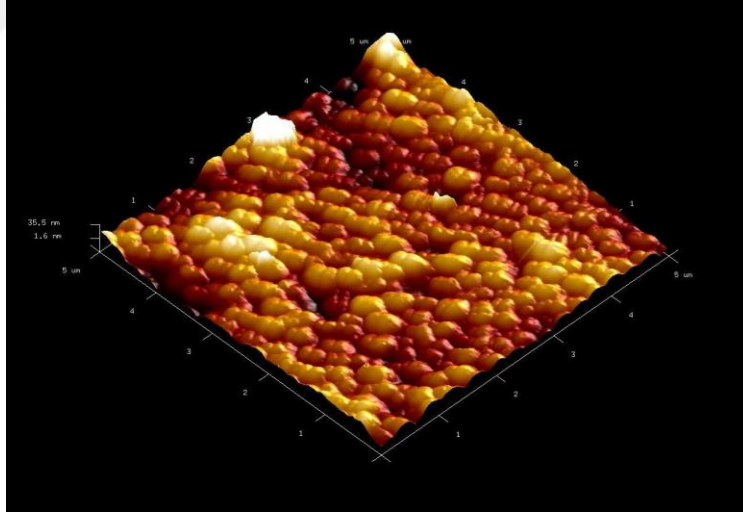
Şekil 16. F10 formülasyonuna ait 2 boyutlu AFM görüntüsü



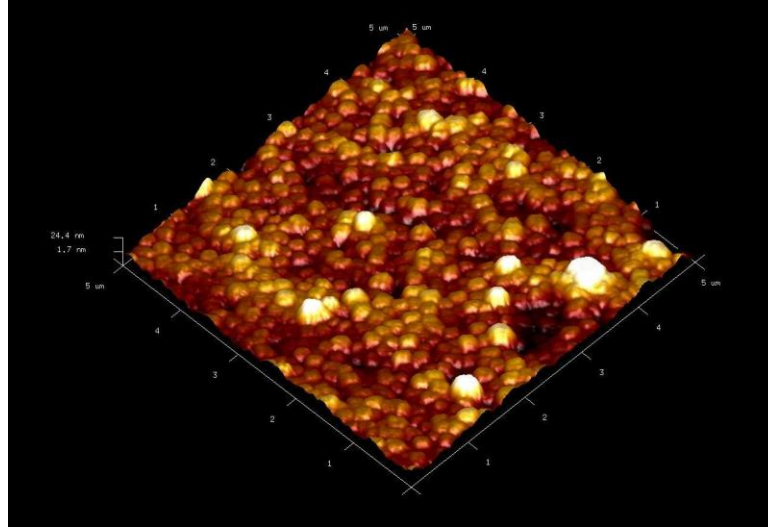
Şekil 17. F13 formülasyonuna ait 2 boyutlu AFM görüntüsü



Şekil 18. F4 formülasyonuna ait 3 boyutlu AFM görüntüsü



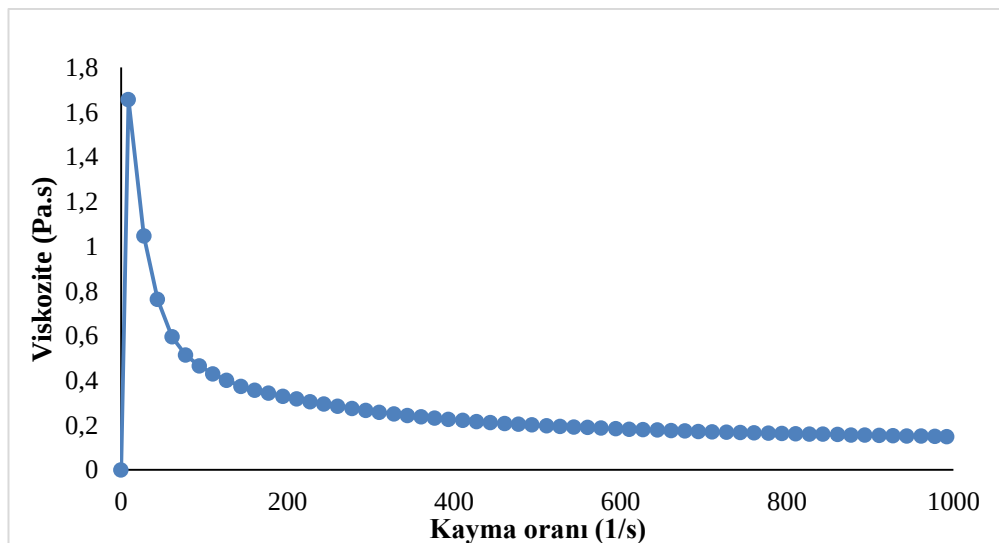
Şekil 19. F10 formülasyonuna ait 3 boyutlu AFM görüntüsü



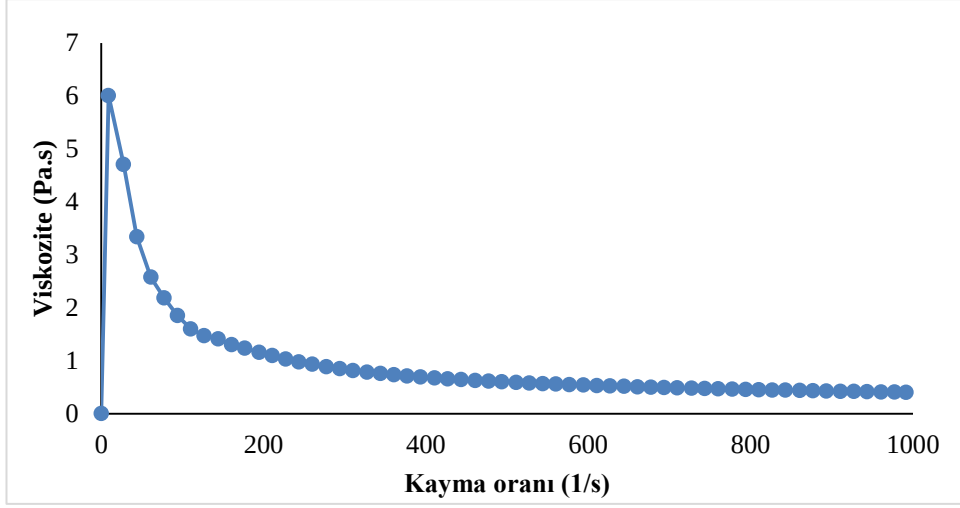
Şekil 20. F13 formülasyonuna ait 3 boyutlu AFM görüntüsü

3.4.3. Optimum Formülasyonların Kayma Oranına Bağlı Viskozite Değişimi

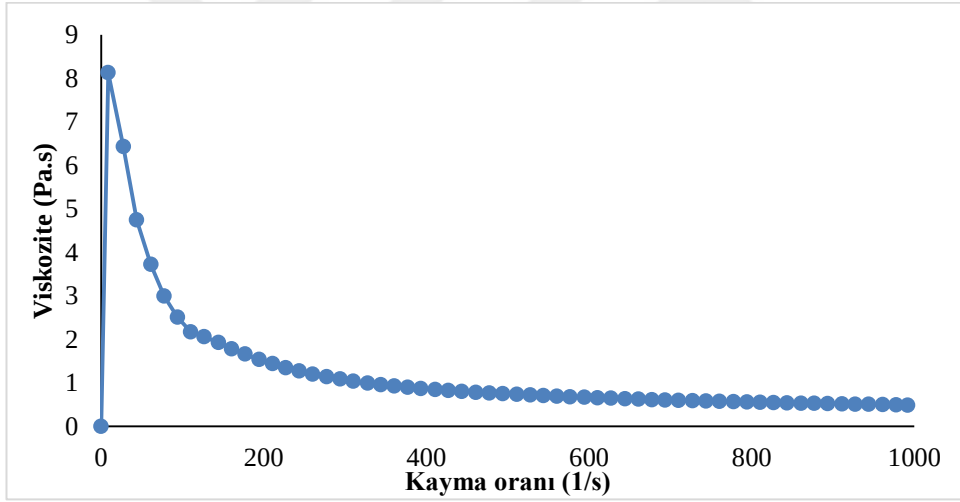
Optimum formülasyonlar olan F4, F10, F13, F28 ve F31 formülasyonlarının 25°C'deki viskozite-kayma oranı grafikleri Şekil 21-25'de verilmiştir. Grafiklerde görüldüğü gibi 25°C'de tüm formülasyonların viskozitesi, kayma hızı arttıkça azalmıştır.



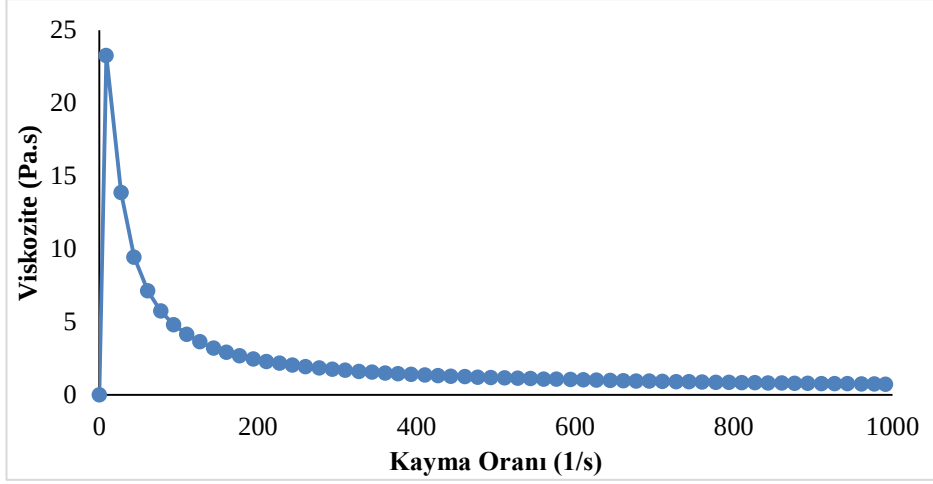
Şekil 21. F4 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi



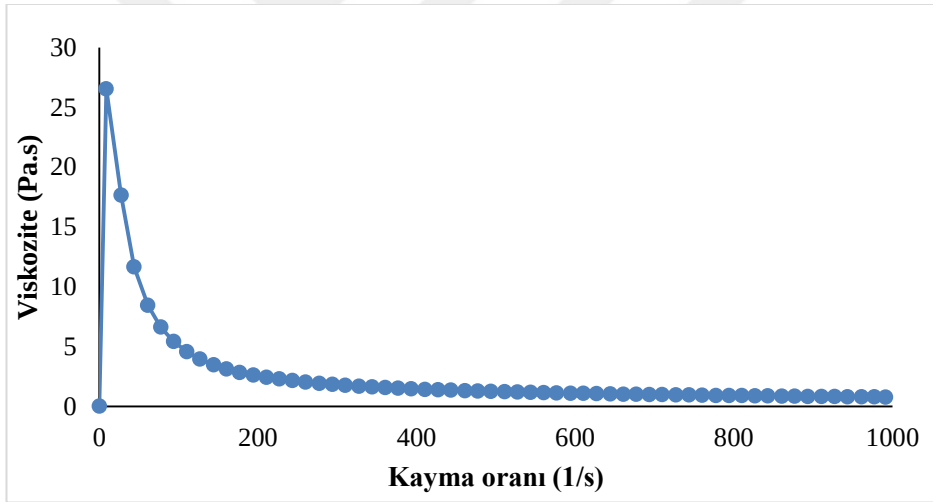
Şekil 22. F10 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi



Şekil 23. F13 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi



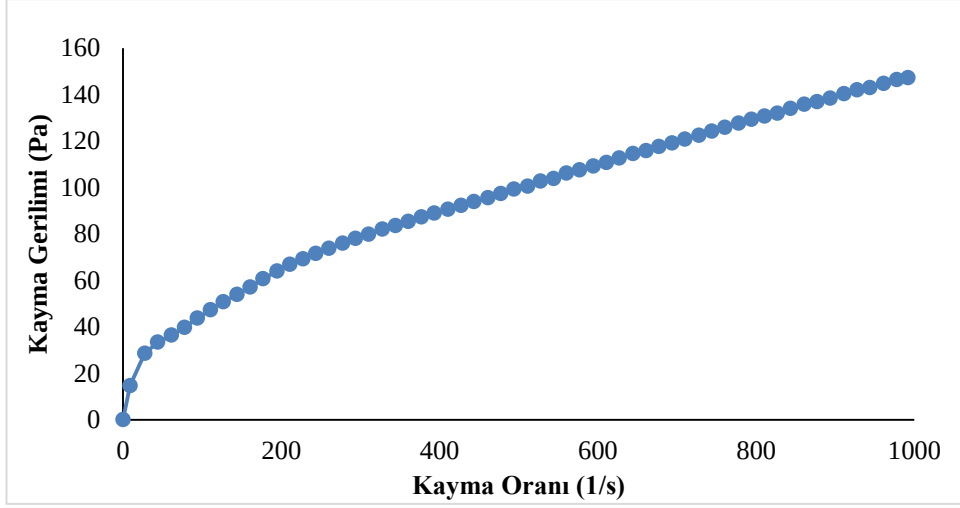
Şekil 24. F28 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi



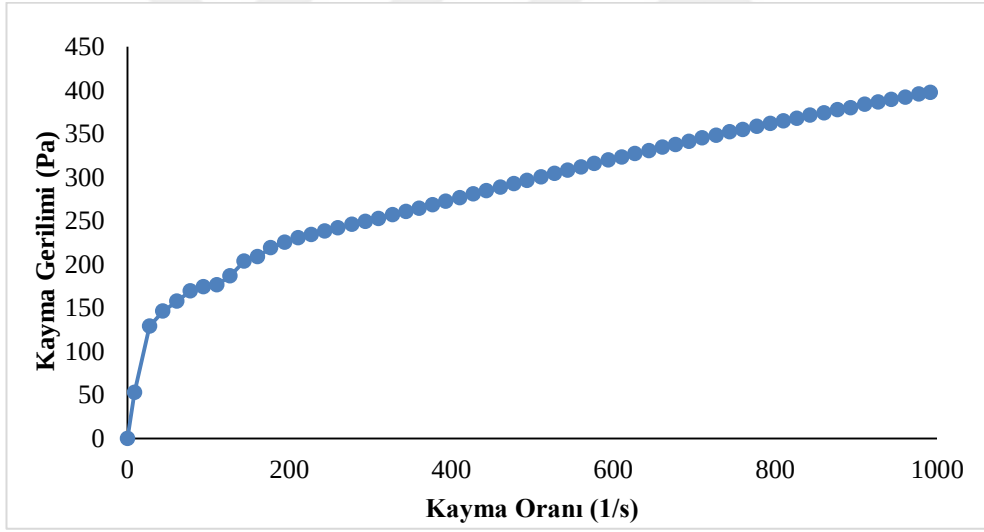
Şekil 25. F31 formülasyonuna ait kayma oranına bağlı viskozite değişimi

3.4.4. Optimum Formülasyonlarının Akış Özelliklerinin Tayini

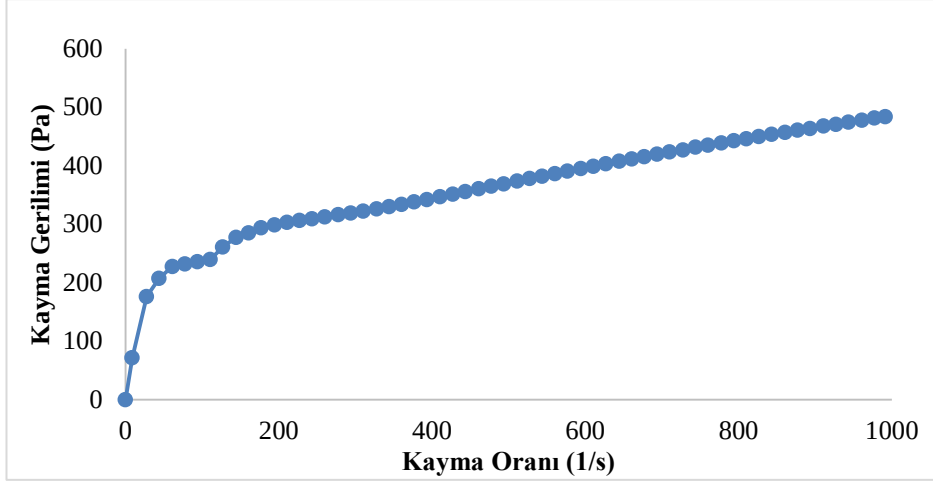
Optimum nanojel formülasyonlarının akış özelliklerinin incelenmesi yöntem 2.2.6.'da anlatıldığı gibi yapıldı. Şekil 26-30'de F4, F10, F13, F28 ve F31 nanojel formülasyonlarına ait 25°C'deki kayma gerilimi-kayma oranı grafikleri gösterildi.



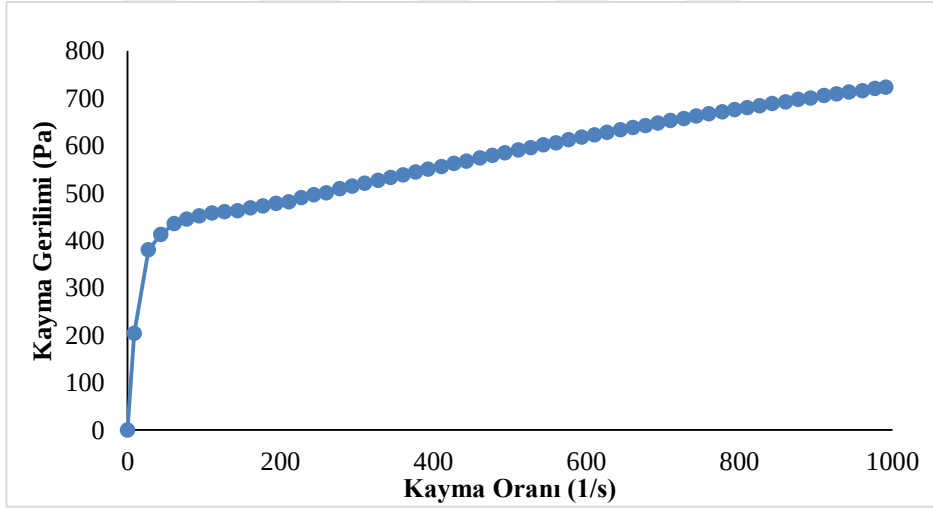
Şekil 26. F4 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi



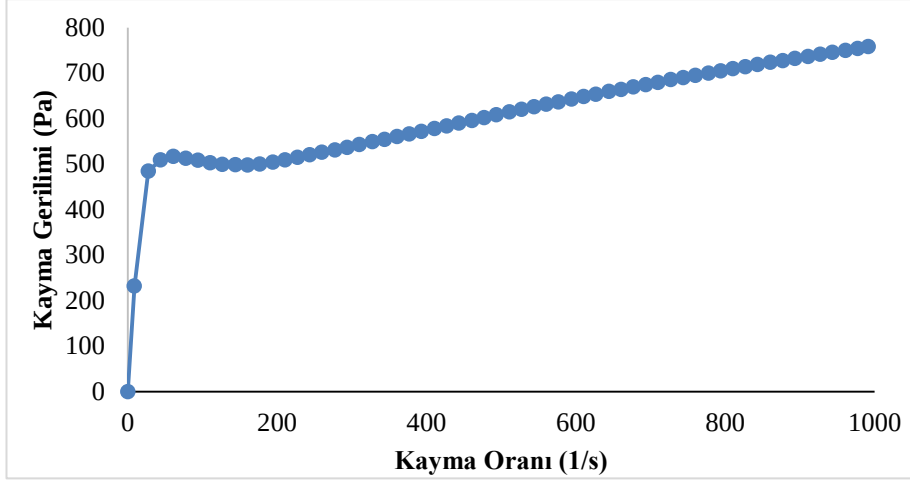
Şekil 27. F10 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi



Şekil 28. F13 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi



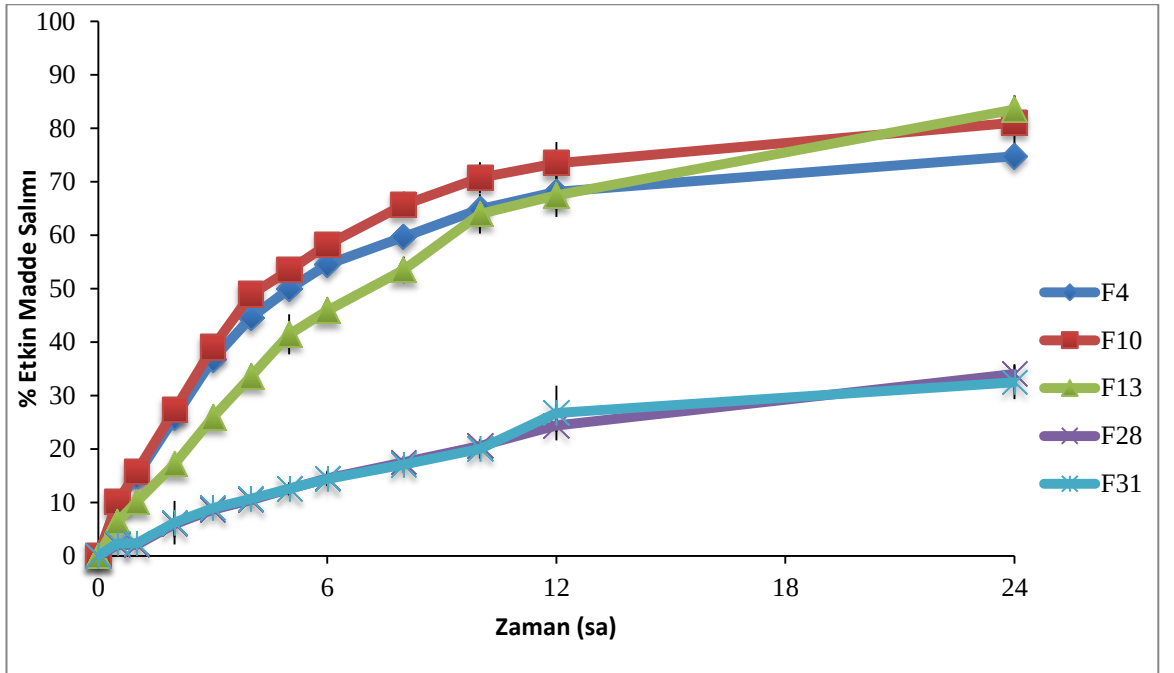
Şekil 29. F28 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi



Şekil 30. F31 formülasyonuna ait 25°C'deki akış eğrisi

3.5. *In Vitro* Salım Çalışmaları

F4, F10, F13, F28 ve F31 kodlu nanojel formülasyonlarına ait diyaliz membran kullanılarak yapılan *in vitro* salım yöntemi 2.2.8.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar aşağıda Şekil 31'de yer almaktadır.



Şekil 31. *In vitro* salım testi sonuçları

3.6. Ex Vivo Çalışmalar

3.6.1. Permeasyon ve Penetrasyon Çalışmaları

Ex vivo penetrasyon ve permeasyon çalışmaları bölüm 2.2.9.1.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 15.'de yer almaktadır.

Tablo 15. Ex vivo permeasyon ve penetrasyon sonuçları

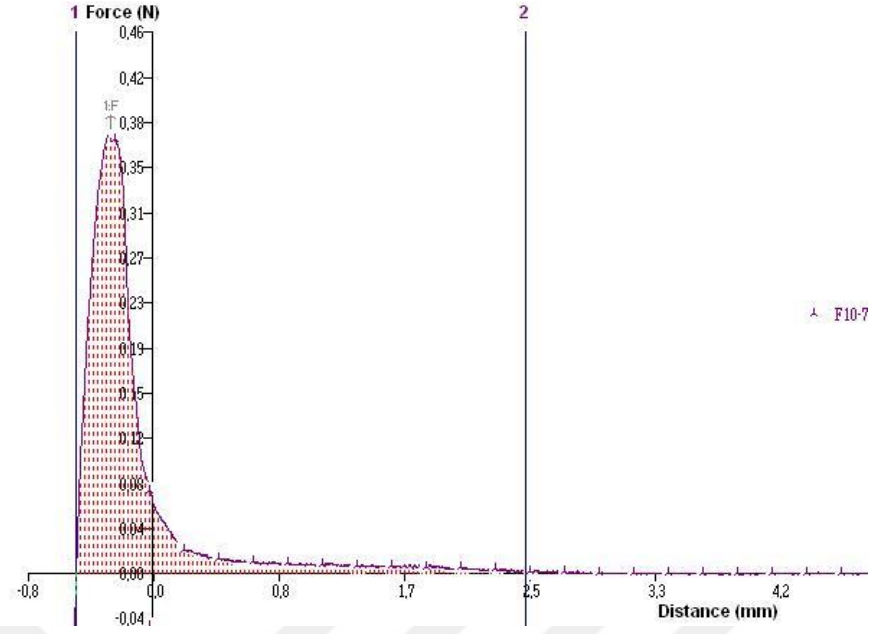
Formülasyon Kodu	24.Saat Sonundaki % Permeasyon	% Penetrasyon
F10	1.068 ± 0.246	1.392 ± 0.659
F13	0.386 ± 0.303	0.868 ± 0.116
F28	0	0.994 ± 0.153

3.6.2. Optimum Formülasyonların Biyoadeziv Özelliklerinin Ölçülmesi

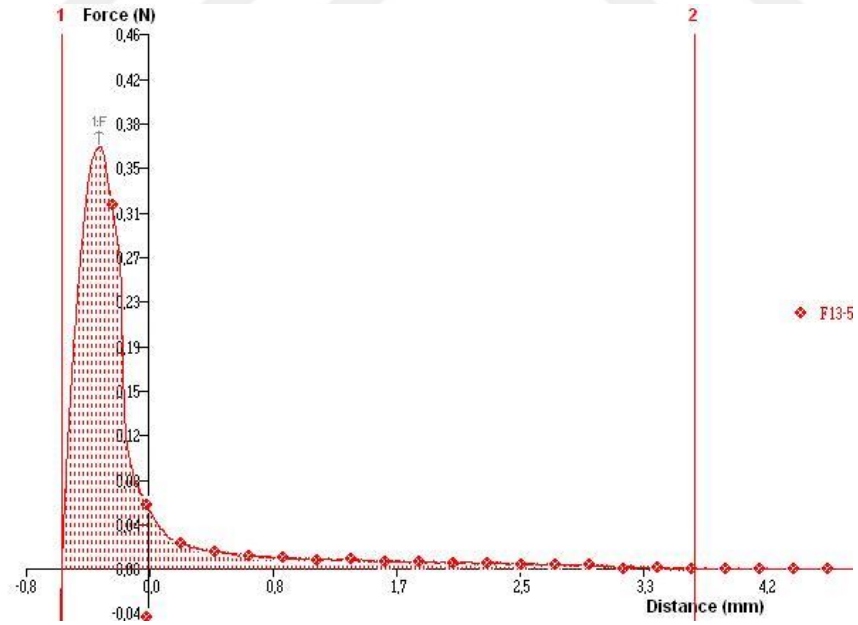
Optimum formülasyonların bölüm 2.2.9.2.'de anlatıldığı gibi Texture Analyser ile biyoadeziv özellikleri ölçüldü. Sonuçlar aşağıdaki Tablo 16'da verildi. F10 ve F13 formülasyonunda mukoadesyon tayininde kullanılan kuvvet-mesafe eğrisi Şekil 32. ve Şekil 33.'de gösterildi.

Tablo 16. F10 ve F13 formülasyonları için ex vivo biyoadezyon çalışması ile elde edilen biyoadezyon işi ve biyoadeziv kuvvet sonuçları

	F10				F13			
	N.mm	N	Biyoadezyon işi mJ/cm2	Biyoadeziv kuvvet N/cm2	N.mm	N	Biyoadezyon işi mJ/cm2	Biyoadeziv kuvvet N/cm2
1	0.18	0.369	0.229	0.47	0.173	0.42	0.22	0.535
2	0.135	0.373	0.172	0.475	0.207	0.377	0.264	0.481
3	0.128	0.346	0.163	0.441	0.137	0.351	0.175	0.447
4	0.143	0.377	0.182	0.48	0.159	0.365	0.203	0.465
5	0.172	0.359	0.219	0.457	0.169	0.35	0.215	0.446
Ortalama	0.152	0.365	0.193	0.465	0.169	0.373	0.215	0.475
SS.	0.021	0.011	0.026	0.014	0.023	0.026	0.029	0.033



Şekil 32. F10 formülasyonunda mukoadazyon tayininde kullanılan kuvvet-mesafe eğrisi



Şekil 33. F13 formülasyonunda mukoadazyon tayininde kullanılan kuvvet-mesafe eğrisi

3.7. Stabilite Çalışmaları

Stabilite çalışmaları bölüm 2.2.10.'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi ve çalışmalar ilerleyen süreçte devam etmektedir. F4, F10, F13, F28 ve F31 formülasyonlarına ait 3 aylık stabilite sonuçları Tablo 17-21 arasında yer almaktadır. %4 CMC içeren bitmiş F10 ve F13 formülasyonlarının 1 aylık stabilite sonuçları Tablo 22 ve Tablo 23'de yer almaktadır.

Tablo 17. F4 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları

Ölçülen Parametre	t=0	1. Ay			2. Ay			3. Ay	
		4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C
Partikül Boyutu (nm)	196.02	201.34	195.44	287.54	222.8	233.34	411.56	316.18	375.68
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	2.93	2.034	5.422	50.436	9.815	1.017	59.756	18.467	6.705
PDI	0.064	0.066	0.078	0.293	0.273	0.24	0.316	0.228	0.221
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.053	0.025	0.049	0.100	0.113	0.009	0.036	0.09	0.023
Zeta Potansiyeli (mV)	28.6	11.2	25.74	26.86	24.02	23.88	27.64	23.42	28.14
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.666	0.738	1.289	1.288	2.086	1.844	4.620	0.717	2.419

Tablo 18. F10 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları

Ölçülen Parametre	t=0	1. Ay			2. Ay			3. Ay		
		4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C	40±1°C
Partikül Boyutu (nm)	475.94	393.64	469	62.388	928.06	338.2	370.775	852.2	329.8	453.72
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	4.392	4.523	48.902	29.151	45.727	63.86	99.224	70.688	37.560	20.1
PDI	0.300	0.195	0,395	0.836	0.558	0.44	0.503	0.43	0.48	0.43
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.051	0.03	0.108	29.151	45.727	63.86	99.224	0.049	0.116	0.019
Zeta Potansiyeli (mV)	18.88	23.18	20.4	13.078	18.42	19.84	13.6	17.78	13.8	6.294
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.356	0.591	1.474	3.197	0.564	0.492	0.974	0.479	0.562	2.714

Tablo 19. F13 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları

Ölçülen Parametre	t=0	1. Ay			2. Ay			3. Ay		
		4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C	40±1°C
Partikül Boyutu (nm)	250.22 ± 4.11	235.54 ± 5.137	254.7 ± 5.74	323.48 ± 113.459	350 ± 12.8	392.3 ± 16.029	471.267 ± 87.788	352.2 ± 5.214	406.36 ± 16.912	135.35 ± 29.98
PDI	0.089 ± 0.052	0.113 ± 0.054	0.069 ± 0.029	0.550 ± 0.237	0.156 ± 0.031	0.197 ± 0.046	0.515 ± 0.075	0.142 ± 0.067	0.376 ± 0.041	0.355 ± 0.044
Zeta Potansiyeli (mV)	20.56 ± 0.330	20.72 ± 0.849	20.66 ± 0.809	18.1 ± 2.060	20.88 ± 0.791	22.84 ± 1.300	17.06 ± 0.467	19.06 ± 1.044	-11.56 ± 0.869	15.7 ± 4.141

Tablo 20. F28 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları

Ölçülen Parametre	t=0	1. Ay			2. Ay			3. Ay	
		4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C
Partikül Boyutu (nm)	364.22 ± 66.963	138.84 ± 4.456	184.72 ± 12.239	548.72 ± 144.197	574.275 ± 119.026	385.08 ± 218.192	366.725 ± 51.703	387.475 ± 113.833	358.225 ± 28.475
PDI	0.428 ± 0.041	0.353 ± 0.027	0.335 ± 0.042	0.516 ± 0.1	0.729 ± 0.093	0.589 ± 0.154	0.429 ± 0.166	0.456 ± 0.075	0.471 ± 0.059
Zeta Potansiyeli (mV)	39.14 ± 0.424	33.64 ± 1.184	38.7 ± 1.911	41.3 ± 1.198	34.42 ± 1.555	36.72 ± 1.211	42.14 ± 2.040	14 ± 1.135	35.94 ± 2.111

Tablo 21. F31 formülasyonuna ait 3 aylık stabilite sonuçları

Ölçülen Parametre	t=0	1. Ay			2. Ay			3. Ay	
		4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C	40±1°C	4±1°C	25±1°C
Partikül Boyutu (nm)	148.28 ± 18.617	193.975 ± 3.732	167.85 ± 9.627	164.28 ± 17.902	827.6 ± 475.355	449.22 ± 234.246	205.333 ± 32.679	279.84 ± 59.129	256.54 ± 19.809
PDI	0.435 ± 0.026	0.485 ± 0.039	0.451 ± 0.050	0.537 ± 0.129	0.798 ± 0.258	0.587 ± 0.165	0.448 ± 0.079	0.471 ± 0.068	0.376 ± 0.101

Zeta	45.68	36.4	36.82	42.18	36.94	42.4	32.48	43.66	42.36
Potansiyeli	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(mV)	0.9	3.357	1.729	2.101	1.274	1.108	3.322	1.933	1.432

Tablo 22. %4 CMC içeren F10 formülasyonuna ait stabilite sonuçları

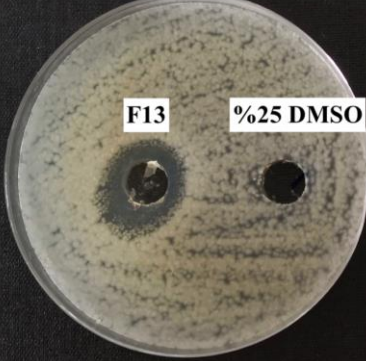
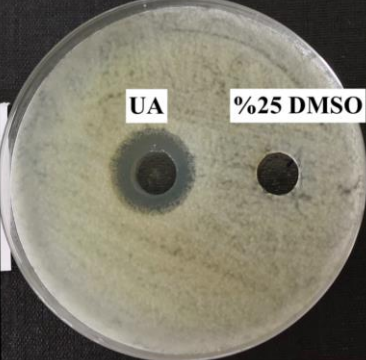
Ölçülen Parametre	t=0	1. Ay		
		4±1°C	25±1°C	40±1°C
% UA Miktar Tayini	96.603 ± 4.824	104.501 ± 2.438	129.9 ± 0.685	122.998 ± 4.631
pH	6.873 ± 0.003	6.728 ± 0.004	6.751 ± 0.005	7.144 ± 0.024
Viskozite	38.28 ± 0.73	38.85 ± 0.997	-	-

Tablo 23. %4 CMC içeren F13 formülasyonuna ait stabilite sonuçları

Ölçülen Parametre	t=0	1. Ay		
		4±1°C	25±1°C	40±1°C
% UA Miktar Tayini	95.146 ± 2.427	104.073 ± 15.451	112.259 ± 2.438	111.03 ± 2.101
pH	6.838 ± 0.011	6.781 ± 0.003	6.813 ± 0.005	6.685 ± 0.004
Viskozite	37.6 ± 0.547	36.583 ± 1.049	-	22.367 ± 1.406

3.8. *In Vitro* Antibakteriyal Etkinlik Tayini

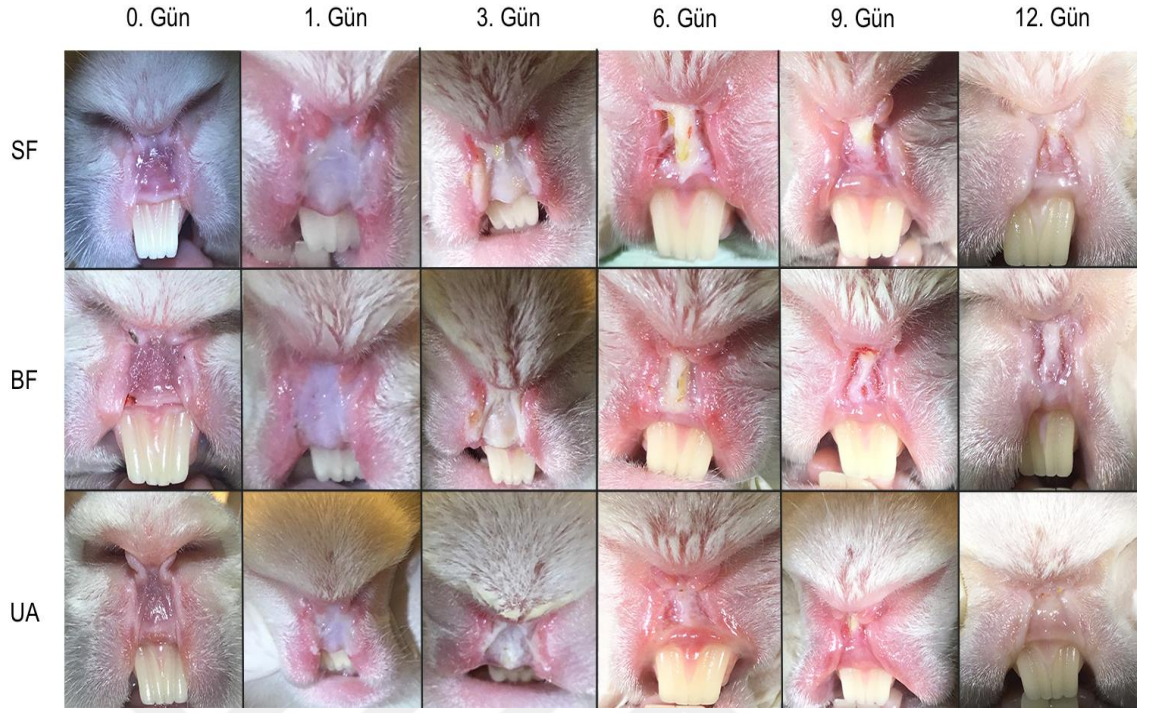
F13 formülasyonunun antibakteriyal etkinlik tayini Bölüm 2.2.11’de anlatıldığı gibi disk difüzyon testi yapılarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 34’te yer almaktadır. UA süspansiyonu 21.5-23 mm zon çapına, F13 formülasyonu 19-19.5 mm aralığında zon çaplarına sahip olduğu tespit edildi.

Formülasyon Kodu	<i>B. cereus</i>
F13 / %25 DMSO	
UA / %25 DMSO	

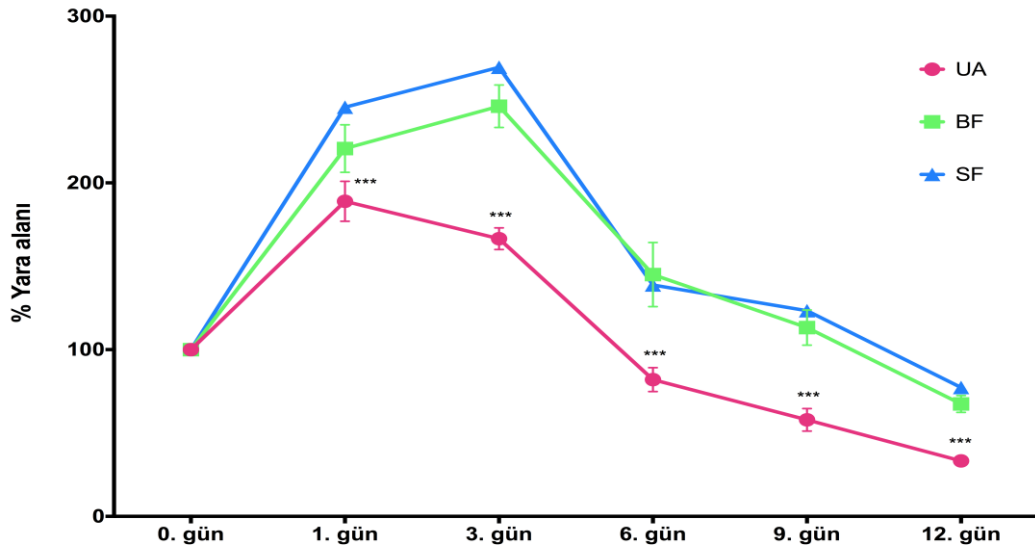
Şekil 34. F13 formülasyonunun *B. cereus* gram pozitif bakterisine karşı etkinlik sonuçları

3.9. *In Vivo* Çalışmalar

In vivo çalışmaları gerçekleştirebilmek için Bezmialem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Merkezinden Etik Kurul Komitesi'nden gerekli izinler alındı ve çalışmamız Bölüm 2.2.12'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi (Etik Kurul Onay No : 2018/58). Çalışmada tavşanların oral labial doku üzerinde ülser modeli oluşturuldu ve model oluşumundan 24 saat sonra 12 gün boyunca günde iki defa olmak üzere tedaviye başlandı. 1., 3., 6., 9., ve 12. günlerde ülserli dokunun fotoğrafları çekildi. Şekil 35'de tavşanların oral ülser oluşumu ve tedavi süreçleri gösterilmektedir. 0. günde oluşturulan ülser alanları ve 12 gün boyunca alanların küçülmesi Şekil 36'da gösterildi.



Şekil 35. Kontrol günlerinde gruplardaki ülser alanlarının görüntüsü

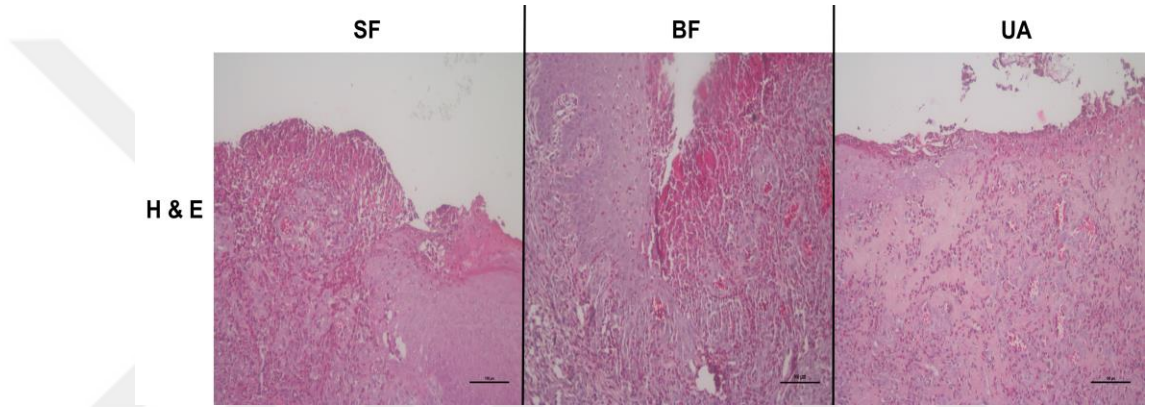


Şekil 36. Ülser alanının günlere göre ölçülmesi.

Kontrol grubuna göre istatistiki olarak değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

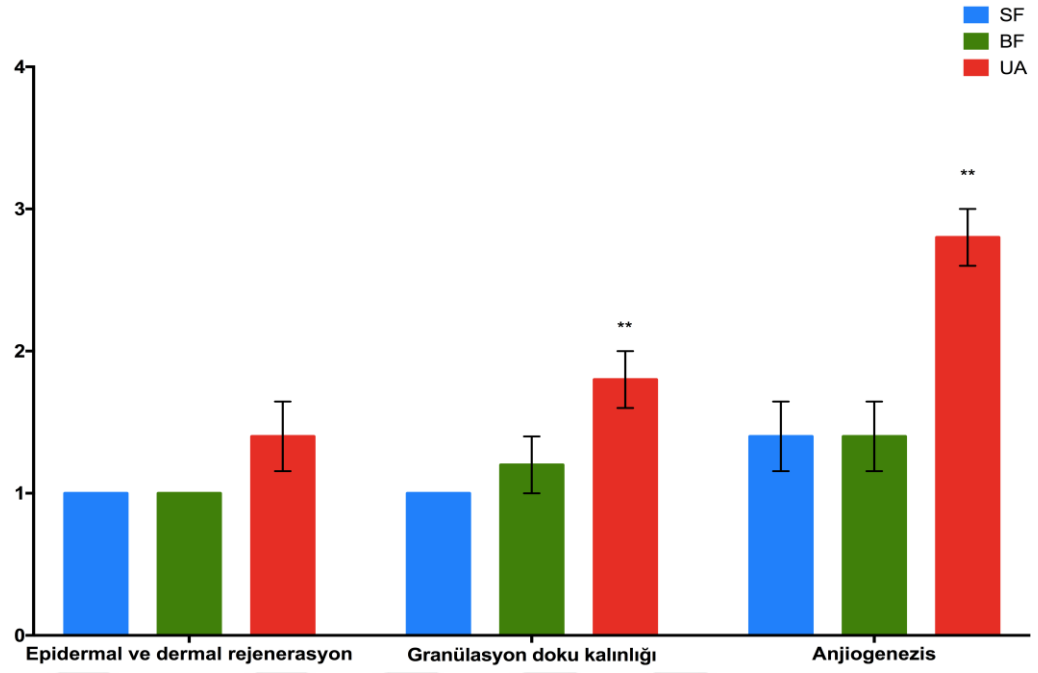
3.10. Histopatolojik İncelemeler

12. günün sonunda yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilen tavşanların bukkal dokusu alınarak histopatolojik incelemeleri Bölüm 2.2.13.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Şekil 37'de oral ülser dokusunun ışık mikroskobu görüntüleri yer almaktadır. Işık mikroskopi ile elde edilen görüntülerde serum fizyolojik grubu, boş nanojel formülasyonu ve UA içeren nanojel formülasyonu karşılaştırılmıştır. UA içeren nanojel formülasyonuna ait görüntülerde anjiyogenez oluşumu diğer gruplardaki görüntülere kıyasla belirgin bir şekilde gözlemlenmektedir.



Şekil 37. Histopatolojik inceleme sonucu oral ülser dokusunun ışık mikroskobu görüntüleri

Yapılan histopatolojik skora ile ülseratif bölgenin epitelizasyonu, granülasyonu doku kalınlığı ve anjiyogenezisi değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 38.'de yer almaktadır.



Şekil 38. Gruplar arasında oral ülser iyileşmesinin histolojik skorlaması

Grafikte görüldüğü üzere UA içeren nanojel formülasyonuna ait grupta ülseratif bölgenin iyileşme sürecini etkileyen faktörlerin, etkin maddenin etkisiyle oluştuğu kanıtlanmıştır.

BÖLÜM IV

4.TARTIŞMA

4.1. Genel Değerlendirme

Çalışmamızın amacı, oral ülser tedavisinde kullanılmak üzere usnik asit içeren bukkal formülasyonların geliştirilmesi, karakterize edilmesi ve hazırlanan formülasyonlardan optimum özellikteki formülasyonların *in vitro* ve *in vivo* özelliklerinin incelenmesidir.

Usnik asit, bilinen bir antimikrobiyal, antibakteriyal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, antiprotozoal, antiproliferatif ve antikanser özelliklere sahip bir maddedir (103,105,117–119). Bu madde, antimikrobiyal özelliğinden dolayı çeşitli yara iyileştirici formülasyonlarda kullanılmış ve etkinliği kanıtlanmıştır (104,107,120). Çalışmamızda usnik asidi etkin madde olarak kullanmamızın sebebi, yapılan literatür araştırmalara göre, dermal yara iyileştirici özelliğinin kanıtlanmış olması, ancak oral ülser tedavisindeki etkinliği ile ilgili bir çalışmanın yapılmamış olması ve piyasada ürünü bulunmamasından dolayı alternatif veya kesin çözüm sağlayabileceği düşünülmektedir.

Oral ülserler tek veya çok sayıda ağrılı, yuvarlak, tekrarlayan ülser olarak görülürler. En sık görülen kompleks aftöz ülserler, genellikle şiddetli ağrı veya sistemik etkilerin eşlik ettiği bir yara ile büyük, derinden uyarılmış ülser olarak kendini gösterir. Anemi, hematinik veya mineral eksiklikleri, enflamatuvar bağırsak hastalığı, glutene duyarlı enteropati veya çoklu immünolojik bozukluklar gibi diğer hastalıklarla ilişkili olabilmektedir (121). Oral ülserlerin etiyolojisi belirlenene kadar, öncelikle semptomatik rahatlama amaçlayan terapötik önlemler alınmaktadır. Sistemik yan etkiler açısından düşük riskleri nedeniyle topikal uygulamalar birinci basamak tedavi olarak tercih edilmelidir (93).

Mukoadezif sistemler hasta tarafından kolaylıkla uygulanabilen yeni bir ilaç uygulama yöntemidir. Merhemler, kremler ve jeller biyoadezif özelliklerinin artırılmasıyla, formülasyonun aksiyon bölgesinde tutulma süresini artırabilmektedir. Jel formülasyonları, ilaç moleküllerini sistemlerden serbest bırakma yeteneklerinden

dolayı ve krem ve merhemlere kıyasla mukozal yüzeylere daha kolay uygulanabilmelerinden dolayı topikal uygulamalar için tercih edilmektedir (87).

Nanojeller, hidrojellerin avantajlarını nano boyutlarından dolayı nano taşıyıcı sistemlerin avantajları ile birleştirir. Polimer sistemlerin çeşitliliği ve fizikokimyasal özelliklerinin kolayca tasarlanması ve uyarlanması, nanojel formülasyonlarının çok yönlü avantajını göstermektedir. Nanojeller, etkin maddelerin hedeflenmesi ve kontrollü salınımı potansiyeli ile birlikte yan etkilerinin azaltılması gibi özelliklere sahiptir (53,122).

4.2. UA'nın Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya başlamadan önce etkin maddemiz olan UA'nın fizikokimyasal özellikleri incelendi. UA'nın IR analizleri yapılmış ve elde edilen pikler ile literatürde yer alan UA'ya ait pikler birbirine uyumlu olduğu görüldü.

UA'nın UV spektrumları literatürde yer alan λ_{max} değerleri ile incelendi. Literatürde bulunan λ_{max} değerleri UV Spektrometrede incelendiğinde 240 nm'de en yüksek absorban değerleri elde edildi.

Etkin maddenin çözünürlük çalışmaları distile su, etanol, aseton, aseton / pH 6.8 tampon çözeltisi (%30 / %70), pH 6.8 tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi. UA'nın aseton içerisindeki çözünürlüğü 4.514 ± 0.148 mg/mL bulunarak çözünürlüğü en yüksek çözücü olarak aseton bulundu.

Jin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada UA'nın farklı çözücülerdeki çözünürlüğü araştırılmıştır. Elde ettikleri sonuçlarda UA'nın asetondaki çözünürlüğü etanol ve distile suya göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar tez çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz çözünürlük çalışmalarını desteklemektedir (123).

4.3. HPLC ile UA'nın Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

Etkin maddenin standart kalibrasyon eğrisini çizmek için aseton içerisinde stok çözeltisi hazırlandı. 0.75 µg/mL, 1.0 µg/mL, 1.5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5.0 µg/mL ve 7.5 ve 10.0 µg/mL konsantrasyonlarına pH 6,8 fosfat tamponu ile seyreltme işlemleri gerçekleştirildi. Elde edilen standart doğrunun denklemi $Y = 85,184x - 12,491$ ve determinasyon katsayısı $R^2 = 0,99942$ olarak bulundu.

HPLC ile geliştirilen yöntemin validasyonunu sağlamak amacıyla ICH kriterleri esas alınarak doğrusalılık, doğruluk ve geri elde edilebilirlik, kesinlik (tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik) ve stabilite çalışmaları yapıldı.

Doğrusallık kriteri formülasyondaki etkin maddenin belli sınırlar içindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun göstergesidir. Başka bir deyişle, maddeye özgü düşük ve yüksek derişim aralıklarını kapsayan yöntemdir.

Kesinlik analitik yöntemin normal çalışma koşullarında tekraredilebilirlik ve tekrar eldeedilebilirlik derecesinin ölçüsüdür. 10 µg/mL konsantrasyonu hazırlanarak HPLC ile 10 kez ard arda okutuldu ve elde edilen sonuçlar Tablo.6’da gösterildi. Varyasyon katsayısının %2’nin altında buluması yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır.

Tekrar edilebilirlik çalışması bir gün arayla 10 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan örnekler HPLC ile okutuldu. 1. gün ve 2. gün sonuçları sonuçları Tablo 7’de gösterildi. Elde edilen sonuçların varyasyon katsayısı %2’den küçük olduğu görüldü.

Doğruluk, elde edilen deneysel değerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunu saptamak amacıyla yapılır. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışması için 2.5, 5, 10 µg/mL konsantrasyonlarının alan değerlerinin kalibrasyon eşitliğinde karşılık geldiği µg/mL değerleri saptandı ve Tablo 9.’da sonuçlar gösterilmektedir.

4.4. UA’nın Minumum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini

Mikrobiyolojik çalışmalar UA’nın MİK değeri belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bacillus cereus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa ve Staphylococcus aureus bakterileri ile çalışma gerçekleştirildi. MİK çalışmalarının sonuçlarının, 0.5 mg/mL’nin altında olması UA’nın bu konsantrasyonda kullanılmasında dikkate alındı.

4.5. Formülasyon Çalışmaları

Formülasyon çalışmalarına başlarken nanojel formülasyonları hazırlama yöntemlerinde kullanılan maddeler incelendi, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen ve mukoadesif özelliğe sahip bir polimer olan kitosan seçildi (56). Nanojel formülasyonları hazırlamak amacıyla kitosan içeren 3 farklı yöntem

denendi. Nanojel formülasyonları; yüksek sıcakta asidik pH'da hazırlama, iyonik jelleşme yöntemi ve kitosan / β -gliserol fosfat nanojelleri hazırlama yöntemleri ile hazırlandı (75,124). Formülasyonların içeriği Tablo 2., Tablo 3. ve Tablo 4.'de gösterildi. Formülasyonlar hazırlanırken düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklarına sahip 3 çeşit kitosan türü kullanıldı. Formülasyonlar hazırlanırken optimum formülasyonun seçilmesinde; formülasyonda nanopartikül oluşumunu gösteren bulanıklığın olmasına, formülasyon içerisinde gözle görülür partikül oluşumunun olmamasına, formülasyon pH'sının bukkal doku pH'sı olan 6.8'e yakın olmasına, formülasyonların partikül boyutu, pdi ve zeta potansiyelinin optimum aralıklarda olmasına dikkat edildi (125).

4.6. Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların karakterizasyon çalışmaları için pH, viskozite, partikül boyutu, pdi, zeta potansiyeli, etkin madde yüklenmesi, reolojik özellikleri, biyoadhezif özellikleri, salım profilleri, permeasyon ve penetrasyon çalışmaları yapıldı.

Formülasyonların partikül boyutları, 150.42 – 6048.2 nm gibi geniş bir aralıkta bulundu. Optimum olarak seçilen formülasyonların partikül boyutları 400 nm'nin altında bulundu.

Polidispersite indeksi parçacıkların boyut dağılımının eşit olmayan derecesini tanımlamaktadır. 0.1 ila 0.25 arasında değişen PDI değeri, partikül boyut dağılımının dar olduğunu, ancak bu değer 0.5'ten büyük olması durumunda da çok geniş bir dağılım gösterdiğini göstermektedir. Uzun vadeli stabilite sağlamak istendiğinde, PDI parametresinin mümkün olduğunca düşük olmasını sağlamak önemlidir (126). Hazırlanan 35 formülasyon, 0.133 – 1 aralığında PDI'ye sahipti. PDI 1'e yaklaştıkça partikül boyutu dağılımı artmaktadır. Optimum olarak 0.5'in altında polidispersiteye sahip formülasyonlar seçildi.

Zeta potansiyeli, kolloidal sistemlerde elektrokinetik potansiyel için bilimsel bir terim ve yüzey yükünün bir ölçüsüdür. Parçacık stabilitesinin yanı sıra hücresel alım ve hücre içi işlemleri etkileyebilir. Kolloidal sistemin stabilitesi iki karşı güç arasındaki dengeye bağlıdır. Bunlar van der Waals kuvvetleri ve elektriksel çift tabakadır. Foton korelasyon spektroskopisi tekniği, zeta potansiyelinin ölçülmesi için

seçildi. Zeta potansiyeli, partiküler sistemlerin stabilite problemlerini tahmin etmede kullanılmaktadır (127). Zeta potansiyeli 30 mV'den yüksek pozitif veya negatif zeta potansiyelleri, monodispersiteye yol açabilmektedir. Öte yandan, 5 mV'dan düşük değerler aglomerasyona yol açabilmektedir. Zeta potansiyeli sadece nanopartiküllerin özelliklerinden değil aynı zamanda pH ve iyonik güç gibi çözeltinin doğasından da etkilenmektedir (126). Zeta potansiyeli partiküler sistemlerde pozitif veya negatif elektriksel yükünün adhere olacağı bölgedeki itme kuvvetlerini etkileyerek biyoadezyona etki ettiği literatürlerde tespit edilmiştir (128).

Islam ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada nanojel formülasyonları hazırlanmış ve formülasyonların zeta potansiyeli, içerisinde bulunan anyonik bileşenlere (aljinat ve TPP) kıyasla fazladan eklenen kitosanın katyonik yük katkısı nedeniyle, pozitif olmuştur (129).

Hazırladığımız nanojel formülasyonları -36.04 ± 0.418 ile 59.46 ± 1.995 arasında zeta potansiyeline sahiptir. Optimum formülasyon olarak kullanılan F13 formülasyonunun zeta potansiyeli de içerisinde bulunan kitosanın etkisiyle 20.56 ± 0.330 olarak bulundu.

CS / BSA nanojel formülasyonları hazırlanırken literatürde bulunan hazırlama tekniğine uygun olarak pH 5.95'e ayarlandı. Formülasyonlara 0.5 mg/mL UA ve %4 CMC eklendikten sonraki pH ölçümünde ise formülasyonların pH'sı 6.8 olarak bulundu. Bukkal mukozaya uygulanacak formülasyonun pH'sı dokuya uygun olduğu görüldü.

Elde edilen karakterizasyon sonuçlarına göre optimum olarak seçilen F4, F10, F13, F28 ve F31 formülasyonlarının hepsi düşük molekül ağırlıklı kitosan içermektedir. Orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan türleri kullanıldığında partikül boyutu ve PDI düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılan formasyonlara göre daha yüksek çıkmaktadır. Formülasyonların viskozitesini arttırma amacıyla eklenen %4 CMC'nin formülasyonların partikül boyutunun değiştirip değiştirmediğini görmek amacıyla etkin madde ve CMC içeren F13 formülasyonlarının partikül boyutu ölçüldü. Elde edilen sonuçlarda formülasyonun $314,65 \pm 4,782$ nm partikül boyutuna sahip olduğu görüldü. Bu sonuçlar bize formülasyonun viskozitesinin arttırılmasının nanopartiküllerin boyutunu etkilemediğini gösterdi.

Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada CS/BSA nanojelleri yüksek sıcaklıkta asidik pH'da oluşturularak doksorubisin hidroklorür etkin maddesi yüklemişlerdir ve partikül boyutu analizi yapılmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre partikül boyutunun 290 nm olduğu görülmektedir (75).

AFM ile yapılan görüntüleme çalışmalarında etkin madde yüklü F4, F10 ve F13 formülasyonları kullanıldı. Formülasyonların 2 boyutlu ve 3 boyutlu görüntüleri elde edildi. Şekil 15-20 arasında elde edilen sonuçlar bulunmaktadır. Bu sonuçlara göre, formülasyondaki partiküller homojen bir dağılım göstermiş olup partikül boyutları Malvern ZetaSizer ile ölçüldüğünde elde edilen sonuçlara uymaktadır. Böylece elde edilen sonuçların tutarlı olduğu kanıtlandı.

4.6.1. Optimum Formülasyonlara Etkin Madde Yüklenmesi

Formülasyonlar hazırlandıktan sonra formülasyonların fiziksel görünüşü, partikül boyutu, polidispersitesi, zeta potansiyeli, pH gibi parametler göz önüne alındığında bukkal biyoadeziv nanojel formülasyonlarına göre optimum formülasyonlar seçildi. Bunlar F4, F10, F13, F28 ve F31 kodlu formülasyonlardır. Optimum seçilen formülasyonlara etkin maddemiz olan UA 0.5 mg/ml konsantrasyonunda ilave edildi. UA'nın piyasada referans alabileceğimiz bir ürününün olmaması dolayısıyla literatürde bulunan yara tedavisinde kullanılan konsantrasyon aralığından en düşük doz formülasyonlara ilave edilmek üzere belirlendi (114). Yapılan MİK çalışmalarının sonuçlarının da 0.5 mg/mL'nin altında olması bu konsantrasyonun seçiminde dikkate alındı.

UA'nın optimum formasyonlara yüklenmesi tamamlandıktan sonra formülasyonlardan her bir formülasyondan 1 g alınarak formülasyon, 10 mL aseton içerisinde çözündürüldü. HPLC hareketli fazı ile gerekli seyreltmeler yapıldı ve 0.2 µm filtreden süzülerek HPLC ile okumalar gerçekleştirildi. Miktar tayini sonucunda optimum formülasyonlarda UA miktarı 96.603 ± 4.824 - 90.753 ± 0.052 arasında bulundu ve sonuçlar Tablo 14.'de gösterildi. İçerik miktar tayini sonuçlarının %90'ın üzerinde bulunması yüklediğimiz UA'nın formülasyona eşit olarak dağıldığını ve istenen miktarda yüklendiğini göstermektedir.

4.6.2. Optimum Formülasyonların Reolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Nanojel formülasyonları reometre cihazı kullanılarak reolojik açıdan incelendi. F4, F10, F13, F28 ve F31 kodlu formülasyonlar ile çalışmalar gerçekleştirildi. Formülasyonların 25°C'deki akış eğrisi ve kayma oranına bağlı olarak viskozite değişim grafikleri çizildi. Jel tipi formülasyonların üretim aşamasında, ambalajlanmasında ve kullanımı sırasında optimum bir viskozite değerine ve uygun akış özelliklerine sahip olması gerekmektedir (130). Bu amaçla F4, F10, F13, F28 ve F31 nanojel formülasyonlarının reometre cihazı ile viskozite ve akış özellikleri incelendi.

Şekil 21-30'de F4, F10, F13, F28 ve F31 nanojel formülasyonlarına ait 25°C'deki viskozite-kayma oranı ve kayma gerilimi-kayma oranı grafikleri verilmiştir. Görüldüğü gibi tüm formülasyonların viskozitesi 25°C'de kayma hızı arttıkça azalmıştır. Jel formülasyonlarının 25°C'de non-Newtonian akış olan pseudoplastik akış gösterdikleri bulunmuştur. Polimer çözeltileri ve polimerleri içeren yarı katı sistemlerin genellikle pseudoplastik akış gösterdiği literatürde bulunmaktadır (130).

4.7. In Vitro Salım Çalışmaları

F4, F10, F13, F28 ve F31 kodlu optimum olarak seçilen formülasyonların *in vitro* salım çalışması ilk olarak diyaliz membran kullanılarak gerçekleştirildi. UA içeren nanojel formülasyonlarından 1 mL diyaliz membranın içerisine kondu. %70 tampon çözeltisi (pH 6.8) %30 aseton içeren 100 mL çözelti beher içerisinde hazırlandı ve hazırlanan diyaliz membran beherin içerisine kondu. 30. dk, 1., 2., 3., 4., 5., 6., 8., 10., 12. ve 24. saatte örnekler alındı ve HPLC'de değerlendirilerek sonuçlar elde edildi. Yapılan çalışmaya göre 24. saat sonunda F4 formülasyonu % 74.780 ± 2.345 , F10 formülasyonu % 81.065 ± 5.000 , F13 formülasyonu % 83.508 ± 2.636 , F28 formülasyonu % 34.054 ± 1.828 , F31 formülasyonu % 32.496 ± 3.180 salım gösterdi. F4, F10 ve F13 formülasyonu yüksek sıcaklıkta asidik pH'da, farklı CS:BSA oranları kullanarak hazırlandı. F28 ve F31 formülasyonları ise iyonik jelleşme ile hazırlanan formülasyonlardır. Nanojel formülasyonlarını hazırlamada farklı yöntemlerin kullanılmasının salım sonuçları üzerindeki etkisi görülmektedir. Yüksek sıcaklıkta asidik pH'da hazırlanan nanojel formülasyonları 24. saatin sonunda daha yüksek salım göstermektedir.

Vysloužil ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ibuprofen etkin maddesi ile hazırladıkları PLGA mikrokürelerinde formülasyon hazırlama parametrelerini değiştirerek *in vitro* salım üzerindeki sonuçların istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştiğini gösterdiler (131).

4.8. Ex Vivo Çalışmalar

4.8.1. Penetrasyon ve Permeasyon Çalışması

Bukkal mukoza uygulama kolaylığı, hızlı etki sağlanması ve yoğun kılcıl damar içermesinden dolayı topikal kullanımı olduğu gibi sistemik dolaşıma geçmesi istenen maddelerin vücuda alımında kullanılan bir bölgedir. Hazırladığımız nanojel formülasyonlarının sistemik etki yaratması istenmemektedir. Oral ülser bölgesinde UA'nın difüze olması ve etkin maddenin antimikrobiyal özelliğinden yararlanılarak bölgedeki ülseratif yaranın iyileştirilmesi planlanmaktadır. Bukkal mukozaya uygulanacak olan formülasyonumuzun sistemik dolaşıma geçip geçmediğini, geçiyorsa geçtiği miktarı ve dokuda kalan miktarını ölçmek için *in vitro* salım çalışması sonucu en yüksek salım gösteren F10, F13 ve F28 kodlu formülasyonlar ile *ex vivo* penetrasyon ve permeasyon çalışmaları gerçekleştirildi. *Ex vivo* çalışmaları hazırlanan formülasyon ile bukkal yüzey arasındaki ilişkiyi anlamamıza yardımcı olmaktadır. Bu amaçla çalışmayı gerçekleştirmek için mezbahadan taze olarak alınan inek bukkal mukozası kullanıldı. Difüzyon çalışmaları Franz difüzyon hücresi kullanılarak gerçekleştirildi. Literatürde Franz difüzyon hücresi ile yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. Sığır bukkal mukozası difüzyon hücresine monte edildi. Franz difüzyon hücresinin donör kısmına UA içeren nanojel formülasyonları yerleştirildi. Yapılan çalışma sonucunda 24. saatin sonunda F10 formülasyonunun $\%1.068 \pm 0.246$ permeasyon $\%1.392 \pm 0.659$ penetrasyon sağladığı görüldü. F13 formülasyonunun ise $\%0.386 \pm 0.303$ permeasyon ve $\%0.868 \pm 0.116$ penetrasyon sağladı. F28 formülasyonu 24. saatin sonunda $\%0$ permeasyon ve $\%0.994 \pm 0.153$ penetrasyon gösterdi. 3 formülasyonun da çok düşük yüzdelerde penetrasyon ve permeasyon göstermesi formülasyonlarımızın neredeyse hiç sistemik dolaşıma geçmediğini ve lokal etkili olduğunu kanıtladı (47).

4.8.2. Ex Vivo Biyoadezyon Özelliklerinin İncelenmesi

F10 ve F13 formülasyonlarının biyoadezif özellikleri Texture Analyzer cihazı ile incelendi. F10 ve F13 formülasyonlarının sırasıyla biyoadezif işleri 0.193 ± 0.026 , 0.465 ± 0.014 olarak bulundu. Biyoadezif kuvvet ise sırasıyla 0.215 ± 0.029 ve 0.475 ± 0.033 olarak bulundu. Sonuçlara bakıldığında, F13 formülasyonu F10 formülasyonuna göre daha yüksek biyoadezif özelliklere sahiptir.

4.9. Stabilité Çalışmaları

Stabilite çalışmaları için optimum olarak seçilen F4, F10, F13, F28 ve F31 formülasyonları %4 CMC eklenmemiş olarak, 4°C’de buzdolabında, 25°C’de oda koşullarında %60 rölatif nem ve 40°C’de %75 rölatif nem içeren stabilite kabini olmak üzere 3 farklı koşula 12 ay boyunca değerlendirilmek üzere kondu. Belli zaman aralıklarında (1., 2., 3., 4., 5., 6., 9. ve 12. aylarda) formülasyonlarda yapılan karakterizasyon çalışmalarında kullanılan parametrelere (partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel) bakıldı. Yapılan diğer karakterizasyon çalışmaları boyunca optimum sonuçlar veren F10 ve F13 formülasyonlarının %4 CMC eklenmiş olarak da bu 3 farklı ortamda 12 ay boyunca bekletilmek üzere yerleştirildi. Etkin madde miktar tayini, pH ve viskozite tayinleri F10 ve F13 formülasyonları için yapıldı. Stabilite sonuçları Tablo 18-24 arasında yer almaktadır. Tez çalışmaları boyunca %4 CMC içermeyen formülasyonların 3 aylık stabilitesine, %4 CMC içeren F10 ve F13 formülasyonlarının 1 aylık stabilitesine bakıldı. Elde edilen sonuçlara göre optimum formülasyon olarak seçilen ve in vivo çalışmaları gerçekleştirilen F13 formülasyonunun 4°C’de buzdolabındaki koşullarda stabil olduğu sonucuna ulaşıldı.

4.10. In Vitro Antibakteriyel Etkinlik Tayini

Kronik yaralar, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalıkta ciddi morbidite ve mortaliteye neden olabilir, çünkü bu tür yaralar dirençli ve dirençsiz bakteriler tarafından kolonize edilmeye daha yatkındır. Antimikrobiyal ajanların, mikrobiyal kontaminasyona karşı bir bariyer oluşturarak daha iyi ve hızlı bir iyileşme sağlayabileceği iddia edilmektedir. Ancak yaralar her türlü invaziv mikrobiyal enfeksiyonlara karşı savunmasız kalır. Bu da yara iltihabına ve sıvı kaybına yol açarak iyileşme sürecine müdahale edebilmektedir (132).

B. cereus gram pozitif bir bakteri olup başta yara enfeksiyonlarında olmak üzere, bakteremia, pnömoni, menenjit gibi bir çok enfeksiyon hastalığına sebebiyet vermektedir. 10-20°C'nin üstündeki ve 35-45°C'nin altındaki sıcaklıklarda çoğalmakta olup optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir (133). Oral bölgenin sıcaklığı *B. cereus*'un üremesinde uygun ortam sağladığı böylece oral ülserlerin iyileşmesini etkileyeceği için formülasyonumuzun *B. cereus* üzerindeki antibakteriyal etkinliğini araştırdık. UA süspansiyonunun, F13 formülasyonunun ve kontrol grubu olarak %25 DMSO çözeltisinin kuyu difüzyon testi ile *B. cereus* bakterisi üzerindeki antibakteriyal etkinlik tayini gerçekleştirildi. UA süspansiyonu 21.5-23 mm zon çapına, F13 formülasyonu 19-19.5 mm aralığında zon çaplarına sahip olduğu tespit edildi.

4.11. *In Vivo* Çalışmalar

In vivo çalışmalar, yapılan tüm diğer karakterizasyon, salım, mikrobiyolojik ve stabilite çalışmaları sonucu optimum olarak seçilen F13 formülasyonu ile yapıldı.

Bu çalışmalarda etkin maddenin ve biyoadeziv taşıyıcı nanojelin yara iyileşmesindeki etkisinin ayrı ayrı araştırılması amacıyla, hem etkin madde içeren nanojel hem de içermeyen nanojel hayvanlara uygulandı.

Çalışmada literatürde bulunan oral ülser oluşturma modeli örnek alınarak yapıldı . Diş eti üzerinde oral ülser modeli oluşturmak için, 2.5-3.0 kg ağırlığında olan toplam 21 adet genç erkek Yeni Zelanda tavşanları kullanıldı. Anestezi altındaki (ketamin hidroklorür 35 mg/kg, ksilazin 5 mg/kg) tavşanlarda aseptik doku nekrozuna neden olmak için, çapı 6 mm olan yuvarlak bir filtre kağıdı, 15 µL % 50 asetik asit içine batırılarak kullanıldı. Yuvarlak ülserler oluşturmak için, asit batırılmış kağıt, tavşanların labiyal gingival dokusuna 60 saniye preslendi. Ülser başlangıcından 24 saatin sonunda formülasyonumuzu günde 2 kere uygulamak üzere tedaviye başlandı.

- Birinci grup sadece aktif madde içermeyen nanojel ile tedavi edildi;
- İkinci grup, UA içeren nanojel ile muamele edildi.
- Üçüncü gruba serum fizyolojik uygulandı.

Nanojel ülseratif bölgeye iğne olmadan bir şırınga yardımıyla uygulandı (Karavana et al., 2012). 0., 1., 3., 6., 9. ve 12. günlerde oral ülser modeli oluşturulan

bölgenin fotoğrafları çekildi (Şekil 35.). Fotoğraflarda görülen ülser alanları 3 grup için de hesaplandı ve karşılaştırılması yapıldı (Şekil 36.). Fotoğraflarda gözle görülür bir şekilde UA içeren nanojel grubunun tedavide diğer gruplara göre daha etkili olduğu kanıtlandı. Yara alanlarının hesaplanarak oluşturulan grafikte de UA içeren nanojel formülasyonlarının tedavide diğer gruplara göre daha etkili olduğu Şekil 36.'da gösterildi.

Histopatolojik çalışmalar, 12. günün sonunda yüksek doz anestezi madde ile sakrifiye edilen tavşanların bukkal dokusu alınarak yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre histolojik skorlamalarda serum fizyolojik, boş nanojel formülasyonu ve UA içeren nanojel formülasyonu gruplarının oral ülser alanlarının mikroskopik görüntüleri Şekil 37'de ve epidermal dermal rejenarasyon, granülasyon doku kalınlığı ve dokularda oluşan anjiyogenez Şekil 38'de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre UA içeren nanojel formülasyonunun uygulandığı grup diğer gruplara göre daha etkili olduğu gösterildi.

Ülseratif bölgelerin tedavi sürecinde vücuttaki bir çok faktör görev almaktadır. Bunlar; sitokinler, büyüme faktörleri, proteazlar, eikosanoidler, kininler ve hücre metabolitlerdir. Bu faktörlerin etkisiyle epidermal büyüme, granülasyon dokusu oluşumu ve anjiyonezis ile dokunun iyileşmesi gerçekleşmektedir (134).

Ülseratif mukozal bölgede usnik asidin etkisiyle daha iyi granülasyon dokusu oluşumu, daha fazla rejeneratif damarlar ve fibroblastlar, kolajen bantlarının daha erken oluşumu ile hasarlı bölgenin iyileşmesini sağlanmaktadır. Anjiyogenez, mevcut damarlardan yeni kan damarlarının büyümesidir. Onarım sürecinin önemli bir yönü ve granülasyon dokusu oluşumunun önemli bir parçasıdır. Hasarlı dokularda kan akışının düzeltilmesi, onarıcı hücrelerin büyümesini ve işlevini desteklemek için gerekli olan oksijen ve besinleri sağlamaktadır (107).

UA içeren nanojel formülasyonunun uygulandığı grup ile diğer gruplar ile karşılaştırıldığında kan damarlarının daha çok oluşmasıyla birlikte ülserli dokunun iyileşmesi usnik asidin etkinliği ile gerçekleştiği gözlemlenmektedir.

BÖLÜM V

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada geliştirilen usnik asit içeren nanojel formülasyonlarının; oral ülser tedavisinde etkin olarak kullanılabilen, ilaç piyasasında kullanılan geleneksel preparatlara alternatif olabilecek formülasyonlar olması hedeflenmiştir.

Etkin madde olarak seçilen usnik asitin fizikokimyasal özelliklerinin, karakterizasyon, *in vitro* salım çalışmalarının, mikrobiyoloji, *ex vivo* ve *in vivo* çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre oral ülser tedavisinde kullanılabileceğine ve hazırlanan nanojel formülasyonunun bukkal uygulamalar için uygun ve yenilikçi olduğu sonucuna varılarak, etkin bir şekilde tedavi sağlayacağını düşünmekte ve önermekteyiz.

Etkin maddenin Türkiye İlaç Piyasası'nda oral mukozaya lokal olarak uygulanan preparatı bulunmamasından dolayı, çalışmanın literatüre ve Türkiye İlaç Piyasasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Viralkumar F. Patel, Fang Liu MBB. Advances in Oral Transmucosal Drug Delivery. 2004;(c):16–7.
2. Hovav AH. Dendritic cells of the oral mucosa. Mucosal Immunol. 2014;7(1):27–37.
3. Squier C, Kremer M. Biology of oral mucosa and esophagus. J Natl Cancer Inst Monogr. 2001;29:7–15.
4. Chinna Reddy P, Chaitanya KSC, Madhusudan Rao Y. A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: current status of formulation and evaluation methods. DARU J Pharm Sci. 2011;19(6):385–403.
5. Fonseca-Santos B, Chorilli M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. Mater Sci Eng C. 2017.
6. Smart JD. Buccal drug delivery. Expert Opin Drug Deliv. 2005;2(3):507–17.
7. Moutsopoulos NM, Konkel JE. Tissue-Specific Immunity at the Oral Mucosal Barrier. Trends Immunol. 2017;xx:1–12.
8. Shojaei AH. Buccal Mucosa As A Route For Systemic Drug Delivery : A Review Epithelium Lamina Propria. J Pharm Pharm Sci. 1998;1(1):15–30.
9. Gilhotra RM, Ikram M, Srivastava S, Gilhotra N. A clinical perspective on mucoadhesive buccal drug delivery systems. J Biomed Res. 2014;28(2):81–97.
10. Mazzarino L, Borsali R, Lemos-Senna E. Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: A new strategy for buccal curcumin release. J Pharm Sci. 2014;103(11):3764–71.
11. Sachan R, Bajpai M. Transdermal Drug Delivery System: a Review. Int J Res Dev Pharm Life Sci. 2013;3(1):748–65.

12. Gawas S, Dev A, Deshmukh G, Rathod S. Current Approaches in Buccal Drug Delivery System. *Pharm Biol Eval*. 2016;3(2):165–77.
13. Raghavendra Rao NG, Shravani B, Srikanth Reddy M. Overview on buccal drug delivery systems. *J Pharm Sci Res*. 2013;5(4):80–8.
14. Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(11):1666–91.
15. Shinkar DM, Dhake AS, Setty CM. Drug Delivery from the Oral Cavity: A Focus on Mucoadhesive Buccal Drug Delivery Systems. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2012;66(5):466–500.
16. Rossi S, Sandri G, Caramella CM. Buccal drug delivery: A challenge already won? *Drug Discov Today Technol*. 2005;2(1):59–65.
17. Shahid K, Mayank V, Geeta A, Hari KSL. Mucoadhesive Drug Delivery System : a Review. *World J Pharm Pharm Sci*. 2016;5(5):392–405.
18. Baloglu E, Karavana SY, Senyigit ZA, Guneri T. Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. *Pharm Dev Technol*. 2011;16(6):627–36.
19. Morales JO, McConville JT. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;77(2):187–99.
20. Russo E, Selmin F, Baldassari S, Gennari CGM, Caviglioli G, Cilurzo F, et al. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2016;32:113–25.
21. Mura P, Cirri M, Mennini N, Casella G, Maestrelli F. Polymeric mucoadhesive tablets for topical or systemic buccal delivery of clonazepam: Effect of cyclodextrin complexation. *Carbohydr Polym*. 2016;152:755–63.
22. Thosar MM. Intra oral sprays -An overview. *Int J Pharm Life Sci*. 2011;2(11):1235–46.

23. Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release*. 2006;114(1):15–40.
24. Amasya G, Karavana SY, Şen T, Baloglu E, Tarimci N. Bioadhesive and mechanical properties of triamcinolone acetonide buccal gels. *Turk J Pharm Sci*. 2012;9(1):1–12.
25. Khutoryanskiy V V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. *Macromol Biosci*. 2011;11(6):748–64.
26. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(11):1556–68.
27. Andrews GP, Lavery TP, Jones DS. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(3):505–18.
28. Ahuja A, Khar RK, Ali J. Mucoadhesive Drug Delivery System. *Pharm Biol Eval*. 2017;4(4):183–7.
29. Amit A, Sharad S, Mohammed Junaid K. Theories and Factors Affecting Mucoadhesive Drug Delivery Systems: a Review. *Int J Res Ayurveda Pharm*. 2011;2(24):1155–61.
30. Asane GS, Nirmal SA, Rasal KB, Naik AA, Mahadik MS, Rao YM. Polymers for mucoadhesive drug delivery system: A current status. *Drug Dev Ind Pharm*. 2008;34(11):1246–66.
31. Rajput G, Majmudar F, Patel J, Thakor R, Rajgor N. Stomach-specific mucoadhesive microsphere as a controlled drug delivery system. *Syst Rev Pharm*. 2010;1(1):70.
32. Navneet N, Jaideep B, Garima S, Lovepreet K, Karan S, Manisha A. Mucoadhesion: a New Polymeric Approach. *Bull Pharm Res*. 2016;6(3):74–82.
33. Roy SK, Prabhakar B. Bioadhesive polymeric platforms for transmucosal drug delivery systems - A review. *Trop J Pharm Res*. 2010;9(1):91–104.

34. Saini G et al. Evaluation Parameters of Mucoadhesive Drug Delivery System. 2015;6(1):4100–9.
35. K SN, A B. Basics and Therapeutic Potential of Oral Mucoadhesive Microparticulate Drug Delivery Systems. *Int J Pharm Clin Res*. 2009;1(1):10–4.
36. Saraswathi B, Balaji A, Umashankar MS. Polymers in mucoadhesive drug delivery system-latest updates. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013;5(SUPPL 3):423–30.
37. Yadav VK, Gupta AB, Kumar R, Yadav JS, Kumar B. Mucoadhesive Polymers: Means of Improving the Mucoadhesive Properties of Drug Delivery System. *J Chem Pharm Res*. 2011;3(6):1089–96.
38. Vasir JK, Tambwekar K, Garg S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *Int J Pharm*. 2003;255(1–2):13–32.
39. Singh R, Sharma D, Garg R. Review on Mucoadhesive Drug Delivery System with Special Emphasis on Buccal Route: An Important Tool in Designing of Novel Controlled Drug Delivery System for the Effective Delivery of Pharmaceuticals. *J Dev Drugs*. 2017;06(01):1–12.
40. Longer MA, Ching HS, Robinson JR. Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery. Oral delivery of chlorothiazise using a bioadhesive polymer. *J Pharm Sci*. 1985;74(4):406–11.
41. Marvola M, Rajaniemi M, Marttila E, Vahervuo K, Sothmann A. Effect of dosage form and formulation factors on the adherence of drugs to the esophagus. *J Pharm Sci*. 1983;72(9):1034–6.
42. Mikos AG, Peppas NA. Bioadhesive analysis of controlled-release systems. IV. An experimental method for testing the adhesion of microparticles with mucus. *J Control Release*. 1990;12(1):31–7.
43. Duchbe D, Ponchel G. Principle and investigation of the bioadhesion mechanism of solid dosage forms. *Biomaterials*. 1992;13(10):709–14.
44. Khairnar GA, Sayyad FJ. Development of buccal drug delivery system based on mucoadhesive polymers. *Int J PharmTech Res*. 2010;2(1):719–35.

45. Onnainty R, Onida B, Páez P, Longhi M, Barresi A, Granero G. Targeted chitosan-based bionanocomposites for controlled oral mucosal delivery of chlorhexidine. *Int J Pharm.* 2016;509(1–2):408–18.
46. Santos TC dos, Rescignano N, Boff L, Reginatto FH, Simões CMO, de Campos AM, et al. Manufacture and characterization of chitosan/PLGA nanoparticles nanocomposite buccal films. *Carbohydr Polym.* 2017;173:638–44.
47. Rençber S, Karavana SY, Yılmaz FF, Eraç B, Nenni M, Özbal S, et al. Development, characterization, and in vivo assessment of mucoadhesive nanoparticles containing fluconazole for the local treatment of oral candidiasis. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:2641–53.
48. Varshosaz J, Taymouri S, Minaiyan M, Rastegarnasab F, Baradaran A. Development and in vitro/in vivo evaluation of HPMC/chitosan gel containing simvastatin loaded self-assembled nanomicelles as a potent wound healing agent. *Drug Dev Ind Pharm.* 2018;44(2):276–88.
49. Fini A, Bergamante V, Ceschel GC. Mucoadhesive gels designed for the controlled release of chlorhexidine in the oral cavity. *Pharmaceutics.* 2011;3(4):665–75.
50. Su JF, Huang Z, Yuan XY, Wang XY, Li M. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydr Polym.* 2010;79(1):145–53.
51. Ke Y, Liu GS, Wang JH, Xue W, Du C, Wu G. Preparation of carboxymethyl cellulose based microgels for cell encapsulation. *Express Polym Lett.* 2014;8(11):841–9.
52. Wani TU, Rashid M, Kumar M, Chaudhary S, Kumar P, Mishra N. Targeting Aspects of Nanogels: An Overview. *Int J Pharm Sci Nanotech Vol.* 2014;7(4):2612–30.
53. Moya-Ortega MD, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Loftsson T. Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm.* 2012;428(1–2):152–63.

54. Sahu P, Kashaw SK, Kushwaha V, Jain S, Iyer AK. pH Responsive biodegradable nanogels for sustained release of bleomycin. *Bioorg Med Chem*. 2017.
55. Sumalatha K, Rao AS, Latha P. In vitro evaluation of nanogel containing Mentha Piperita. *Am J Biol Pharm Res*. 2014;1(3):136–9.
56. Yao Y, Xia M, Wang H, Li G, Shen H, Ji G, et al. Preparation and evaluation of chitosan-based nanogels/gels for oral delivery of myricetin. *Eur J Pharm Sci*. 2016;91:144–53.
57. Sultana F, Manirujjaman, Imran-Ul-Haque, Arafat M, Sharmin S. An overview of nanogel drug delivery system. *J Appl Pharm Sci*. 2013;3(8 SUPPL):95–105.
58. Soni G, Yadav KS. Nanogels as potential nanomedicine carrier for treatment of cancer: A mini review of the state of the art. *Saudi Pharm J*. 2016;24(2):133–9.
59. Li N, Wang J, Yang X, Li L. Novel nanogels as drug delivery systems for poorly soluble anticancer drugs. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;83(2):237–44.
60. Zarekar NS, Lingayat VJ, Pande V V. Nanogel as a Novel Platform for Smart Drug Delivery System. *Nanosci Nanotechnol Res*. 2017;4(1):25–31.
61. Oh JK, Lee DI, Park JM. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog Polym Sci*. 2009;34(12):1261–82.
62. Singka GSL, Samah NA, Zulfakar MH, Yurdasiper A, Heard CM. Enhanced topical delivery and anti-inflammatory activity of methotrexate from an activated nanogel. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;76(2):275–81.
63. Zhang H, Zhai Y, Wang J, Zhai G. New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;60:560–8.
64. Yurdasiper A, Ertan G, Heard CM. Enhanced delivery of naproxen to the viable epidermis from an activated poly N-isopropylacrylamide (PNIPAM)

Nanogel: Skin penetration, modulation of COX-2 expression and rat paw oedema. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2018;14(7):2051–9.

65. Soni KS, Desale SS, Bronich TK. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *J Control Release.* 2016;240:109–26.

66. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release.* 2004;100(1):5–28.

67. Debele TA, Mekuria SL, Tsai HC. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Mater Sci Eng C.* 2016;68:964–81.

68. Chacko RT, Ventura J, Zhuang J, Thayumanavan S. Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(9):836–51.

69. Oh JK, Tang C, Gao H, Tsarevsky N V., Matyjaszewski K. Inverse Miniemulsion ATRP: A New Method for Synthesis and Functionalization of Well-Defined Water-Soluble/ Cross-Linked Polymeric Particles. *J AM CHEM SOC.* 2006;128(16):5578–84.

70. Tahara Y, Akiyoshi K. Current advances in self-assembled nanogel delivery systems for immunotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;95:65–76.

71. Oh JK, Drumright R, Siegwart DJ, Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog Polym Sci.* 2008;33(4):448–77.

72. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* 2018;10(2):1–17.

73. Bahari LAS, Hamishehkar H. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; A comparative literature review. *Adv Pharm Bull.* 2016;6(2):143–51.
74. Lin PC, Lin S, Wang PC, Sridhar AR. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv.* 2014;32(4):711–26.
75. Wang Y, Xu S, Xiong W, Pei Y, Li B, Chen Y. Nanogels fabricated from bovine serum albumin and chitosan via self-assembly for delivery of anticancer drug. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2016;146:107–13.
76. Rolland JP, Maynor BW, Euliss LE, Exner AE, Denison GM, Desimone JM, et al. Direct Fabrication and Harvesting of Direct Fabrication and Harvesting of Monodisperse. *Supporting Inf.* 2005;127(28):10096–100.
77. Ozawa Y, Sawada SI, Morimoto N, Akiyoshi K. Self-assembled nanogel of hydrophobized dendritic dextrin for protein delivery. *Macromol Biosci.* 2009;9(7):694–701.
78. Fujioka-Kobayashi M, Ota MS, Shimoda A, Nakahama KI, Akiyoshi K, Miyamoto Y, et al. Cholesteryl group- and acryloyl group-bearing pullulan nanogel to deliver BMP2 and FGF18 for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2012;33(30):7613–20.
79. Look M, Bandyopadhyay A, Blum JS, Fahmy TM. Application of nanotechnologies for improved immune response against infectious diseases in the developing world. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(4–5):378–93.
80. Temmerman ML De, Rejman J, Demeester J, Irvine DJ, Gander B, De Smedt SC. Particulate vaccines: On the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discov Today.* 2011;16(13–14):569–82.
81. Sunasee R, Wattanaarsakit P, Ahmed M, Lollmahomed FB, Narain R. Biodegradable and nontoxic nanogels as nonviral gene delivery systems. *Bioconjug Chem.* 2012;23(9):1925–33.

82. Look M, Stern E, Wang QA, DiPlacido LD, Kashgarian M, Craft J, et al. Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1741–9.
83. Abd El-Rehim HA, Swilem AE, Klingner A, Hegazy ESA, Hamed AA. Developing the potential ophthalmic applications of pilocarpine entrapped into polyvinylpyrrolidone-poly(acrylic acid) nanogel dispersions prepared by radiation. *Biomacromolecules.* 2013;14(3):688–98.
84. Wu W, Mitra N, Yan ECY, Zhou S. Multifunctional Hybrid Nanogel for and Self-Regulated Insulin Release at Physiological pH. *ACS Nano.* 2010;4(8):4831–9.
85. Manna S, Lakshmi US, Racharla M, Sinha P, Kanthal LK, Kumar SPN. Bioadhesive HPMC gel containing gelatin nanoparticles for intravaginal delivery of tenofovir. *J Appl Pharm Sci.* 2016;6(8):22–9.
86. Goel A, Commission IP, Pradesh U, Hamdard J. Anti-Inflammatory Activity Of Nanogel Formulation Of 3-Acetyl- 11-Keto-B-Boswellic Acid. *Pharmacologyonline.* 2009;3:311–8.
87. Karavana SY, Sezer B, Güneri P, Veral A, Boyacioğlu H, Ertan G, et al. Efficacy of topical benzydamine hydrochloride gel on oral mucosal ulcers: An in vivo animal study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;40(9):973–8.
88. Lehman JS, Rogers RS. Acute oral ulcers. *Clin Dermatol.* 2016;34(4):470–4.
89. Scully C, Shotts R. Mouth ulcers and other causes of orofacial soreness and pain. *West J Med.* 2001;174(6):421–4.
90. Natah SS, Kontinen YT, Enattah NS, Ashammakhi N, Sharkey KA, Häyrynen-Immonen R. Recurrent aphthous ulcers today: A review of the growing knowledge. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(3):221–34.
91. Lim YS, Kwon SK eun, Park JH yun, Cho CG un, Park SW, Kim WK yung. Enhanced mucosal healing with curcumin in animal oral ulcer model. *Laryngoscope.* 2016;126(2):E68–73.

92. Edgar NR, Saleh D, Miller RA. Recurrent Aphthous Stomatitis: A Review. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2017;10(3):26–36.
93. Altenburg A, El-Haj N, Micheli C, Puttkammer M, Abdel-Naser MB, Zouboulis CC. The Treatment of Chronic Recurrent Oral Aphthous Ulcers. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111(40):665–73.
94. Akintoye SO, Greenberg MS. Recurrent Aphthous Stomatitis. *Dent Clin North Am*. 2014;58(2):281–97.
95. De Rossi SS, Ciarrocca K. Oral Lichen Planus and Lichenoid Mucositis. *Dent Clin North Am*. 2014;58(2):299–313.
96. Bulur I, Onder M. Behçet disease: New aspects. *Clin Dermatol*. 2017;35(5):421–34.
97. Samim F, Auluck A, Zed C, Williams PM. Erythema multiforme. A review of epidemiology, pathogenesis, clinical features, and treatment. *Dent Clin North Am*. 2013;57(4):583–96.
98. Sedghizadeh PP, Shuler CF, Allen CM, Beck FM, Kalmar JR. Celiac disease and recurrent aphthous stomatitis: A report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94(4):474–8.
99. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol*. 2016;34(4):487–94.
100. Chattopadhyay A, Shetty K V. Recurrent aphthous stomatitis. *Otolaryngol Clin North Am*. 2011;44(1):79–88.
101. Belenguer-Guallar I, Jiménez-Soriano Y, Claramunt-Lozano A. Treatment of recurrent aphthous stomatitis. A literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(2):168–74.
102. Segatore B, Bellio P, Setacci D, Brisdelli F, Piovano M, Garbarino JA, et al. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI model methods. *Phytomedicine*. 2012;19(3–4):341–7.

103. Francolini I, Norris P, Piozzi a, Donelli G, Stoodley P. Usnic Acid , a Natural Antimicrobial Agent Able To Inhibit Bacterial Biofilm Formation on Polymer Surfaces. Society. 2004;48(11):4360–5.
104. Bruno M, Trucchi B, Burlando B, Ranzato E, Martinotti S, Akkol EK, et al. (+)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. Bioorganic Med Chem. 2013;21(7):1834–43.
105. Cocchietto M, Skert N, Nimis P, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften. 2002;89(4):137–46.
106. Qu C, Zhang L, Du X, Zhang X, Zheng J, Zhao Y, et al. Preparation and evaluation of wet-milled usnic acid nanocrystal suspension for better bioaffinity. Drug Dev Ind Pharm. 2017;0(0):1–6.
107. Zhang Z, Zheng Y, Li Y, Bai H, Ma T, Song X, et al. The effects of sodium usnic acid by topical application on skin wound healing in rats. Biomed Pharmacother. 2018;97(October 2017):587–93.
108. Ribeiro-Costa RM, Alves AJ, Santos NP, Nascimento SC, Gonçalves ECP, Silva NH, et al. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. J Microencapsul. 2004;21(4):371–84.
109. Takai M, Uehara Y. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. J Med Chem. 1979;22(11):1380–4.
110. Shtro AA, Zarubaev V V., Luzina OA, Sokolov DN, Kiselev OI, Salakhutdinov NF. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus. Bioorganic Med Chem. 2014;22(24):6826–36.
111. Bézivin C, Tomasi S, Rouaud I, Delcros JG, Boustie J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: Cladonia convoluta. Planta Med. 2004;70(9):874–7.
112. Guo L, Shi Q, Fang JL, Mei N, Ali AA, Lewis MS, et al. Review of Usnic Acid and Usnea Barbata Toxicity. 2008;26(4):317–8.

113. Yu S, Hu J, Pan X, Yao P, Jiang M. Stable and pH-sensitive nanogels prepared by self-assembly of chitosan and ovalbumin. *Langmuir*. 2006;22(6):2754–9.
114. Lira MCB, Siqueira-Moura MP, Rolim-Santos HML, Galetti FCS, Simioni AR, Santos NP, et al. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Liposome Res*. 2009;19(1):49–58.
115. Karavana SY, Gökçe EH, Rençber S, Özbal S, Pekçetin Ç, Güneri P, et al. A new approach to the treatment of recurrent aphthous stomatitis with bioadhesive gels containing cyclosporine A solid lipid nanoparticles: In vivo/in vitro examinations. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5693–704.
116. Galeano M, Altavilla D, Bitto A, Minutoli L, Calò M, Lo Cascio P, et al. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med*. 2006;34(4):1139–46.
117. Mayer M, O'Neill MA, Murray KE, Santos-Magalhães NS, Carneiro-Leão AMA, Thompson AM, et al. Usnic acid: A non-genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anticancer Drugs*. 2005;16(8):805–9.
118. Ingolfssdottir K. Usnic acid. *Phytochemistry*. 2002;61(7):729–36.
119. Cansaran D, Atakol O, Halici MG, Aksoy A. HPLC analysis of usnic acid in some Ramalina species from anatolia and investigation of their antimicrobial activities. *Pharm Biol*. 2007;45(1):77–81.
120. Nunes PS, Rabelo AS, Souza JCC de, Santana BV, da Silva TMM, Serafini MR, et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. *Int J Pharm*. 2016;513(1–2):473–82.
121. Zhang C, Liu Y, Li W, Gao P, Xiang D, Ren X, et al. Mucoadhesive buccal film containing ornidazole and dexamethasone for oral ulcers: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pharm Dev Technol*. 2018;0(0):1–9.

122. Neamtu I, Rusu AG, Diaconu A, Nita LE, Chiriac AP. Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications. *Drug Deliv.* 2017;24(1):539–57.
123. Jin JQ, Rao Y, Bian XL, Zeng AG, Yang G De. Solubility of (+)-usnic acid in water, ethanol, acetone, ethyl acetate and n-hexane. *J Solution Chem.* 2013;42(5):1018–27.
124. El-Feky GS, El-Banna ST, El-Bahy GS, Abdelrazek EM, Kamal M. Alginate coated chitosan nanogel for the controlled topical delivery of Silver sulfadiazine. *Carbohydr Polym.* 2017;177(August):194–202.
125. Aframian DJ, Davidowitz T, Benoliel R. The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Dis.* 2006;12(4):420–3.
126. Gumustas M, Sengel-Turk CT, Gumustas A, Ozkan SA, Uslu B. Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics.* Elsevier Inc.; 2017. 67-108 p.
127. Üstündag-Okur N, Gökçe EH, Eğrilmez S, Özer Ö, Ertan G. Novel Ofloxacin-Loaded Microemulsion Formulations for Ocular Delivery. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2014;30(4):319–32.
128. McCarron PA, Donnelly RF, Canning PE, McGovern JG, Jones DS. Bioadhesive, non-drug-loaded nanoparticles as modulators of candidal adherence to buccal epithelial cells: A potentially novel prophylaxis for candidosis. *Biomaterials.* 2004;25(12):2399–407.
129. Islam P, Water JJ, Bohr A, Rantanen J. Chitosan-based nano-embedded microparticles: Impact of Nanogel composition on physicochemical properties. *Pharmaceutics.* 2017;9(1):1–12.
130. Acartürk F., Ağabeyoğlu İ., Çelebi N., Değim T., Değim Z., Doğanay T., Takka S. TF. Reoloji. In: *Modern Farmasötik Teknoloji: Reoloji.* Ankara; 2007. p. 391–4.

131. Vysloužil J, Doležel P, Kejdušová M, Mašková E, Mašek J, Lukáč R, et al. Influence of different formulations and process parameters during the preparation of drug-loaded PLGA microspheres evaluated by multivariate data analysis. *Acta Pharm.* 2014;64(4):403–17.
132. Okur ME, Ayla Ş, Çiçek Polat D, Günel MY, Yoltaş A, Biçeroğlu Ö. Novel insight into wound healing properties of methanol extract of *Capparis ovata* Desf. var. *palaestina* Zohary fruits. *J Pharm Pharmacol.* 2018;70(10):1401–13.
133. Drobniewski FA. *Bacillus cereus* and Related Species. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(4):324–38.
134. Ayla Ş, Günel MY, Sayın Şakul AA, Biçeroğlu Ö, Özdemir EM, Okur ME, et al. Effects of *Prunus spinosa* L. fruits on experimental wound healing. *Medeni Med J.* 2017;32(3):152–8.

TEZ ÇALIŞMASINDAN SUNULAN POSTER BİLDİRİLERİ

1. Nesrin Hökenek, Neslihan Üstündağ Okur, Sinem Yaprak Karavana, Nanogel Formulations Prepared by Self Assembly for Buccal Drug Delivery, 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 19-22 Mart 2018, Granada, İspanya
2. Nesrin Hökenek, Neslihan Üstündağ Okur, Sinem Yaprak Karavana, Preparation, Characterization and *In Vitro* Release Studies of Usnic Acid Loaded Nanogel Formulations for Oral Ulcer Treatment, 19th International Pharmaceutical Technology Symposium, syf. 250-251, 17-19 Eylül, Antalya, Türkiye



ÖZGEÇMİŞ

Nesrin HÖKENEK

nesrinhokenek@gmail.com

Kartaltepe Mah. Bağlar Mevkii Sok. 28/13 Bakırköy/İSTANBUL

05454889454

Kişisel Bilgilerim:

Uyruk : Türkiye

Doğum tarihi & yeri : 26.02.1993 & Bakırköy

Medeni durum : Bekar

Eğitim Bilgileri:

Yüksek Lisans

2016-2018 Ege Üniversitesi - Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji
Anabilim Dalı

Üniversite

2011-2016 İstanbul Medipol Üniversitesi - Eczacılık Fakültesi

Lise

2007-2011 Yeşilköy Anadolu Lisesi

İş tecrübesi:

28.03.2017-Halen İstanbul Medipol Üniversitesi Farmasötik Teknoloji
Anabilim Dalı - Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil:

» İngilizce Okuma:İyi Yazma:İyi Konuşma: İyi

Sınav Sonuçları:

ALES : 92,841

YÖKDİL : 70

Bilgisayar Programları:

MS Office Programları

Adobe Photoshop CS

Kulüp/Dernek Üvelliği:

1. TÜFTAD (Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği)
2018-Halen Üye



**T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ**

SAYI: 2018/58

22.03.2018

KONU: Sn. Doç. Dr. Sinem Yaprak KARAVANA

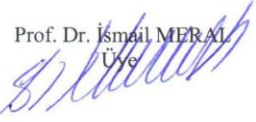
Sayın, Doç. Dr. Sinem Yaprak KARAVANA

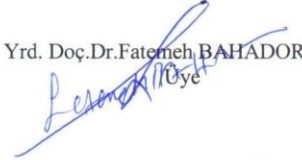
“Oral Ülser Tedavisinde Kullanılmak Üzere Usnik Asit İçeren Bukkal Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve İn-vitro ve İn-vivo Değerlendirilmesi” başlıklı projenize ait başvurunuz 22.03.2018 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve her bir grup için denek sayısının yediye düşürülmesi kaydıyla onanmıştır.

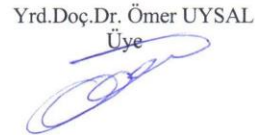

Doç. Dr. Fahri AKBAS
Etik Kurul Başkanı


Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

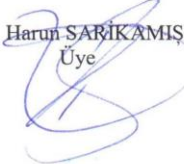

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye


Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye


Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ
Üye


Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye


Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye


Harun SARIKAMİŞ
Üye


Şerife GÖNCÜ
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMA MERKEZİ

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI
CERTIFICATE OF ANIMAL USE IN EXPERIMENTAL RESEARCH
NESRİN HÖKENEK

İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından düzenlenen 80 saatlik
"VIII. Deneysel Hayvanlar Kullanım Sertifikası Eğitim Kursu"na katılarak teorik ve pratik eğitimlerini tamamlamış ve sınavda başarılı
olmuştur.

Has completed the 80 hours course and passed the examination in "Use of Experimental Animals Certification
Training Course, 8 th Edit" organized by The Local Ethics Committee for Animal Experiments of Istanbul
Medipol University.

13 -24 Kasım, 2016 / November 13 -24, 2016 İstanbul, Türkiye/Istanbul, Turkey


Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANI /
HEAD OF THE ANIMAL RESEARCH ETHICS COMMITTEE


Prof. Dr. Sabahattin AYDIN
REKTÖR / RECTOR



İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIP ARAŞTIRMA MERKEZİ