



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



BETA GLUKAN'IN YARA İYİLEŞTİRME ÜZERİNE ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Ec. Kıvanç TÜRK

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

İzmir

2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

BETA GLUKAN'IN YARA İYİLEŞTİRME ÜZERİNE ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Kıvanç TÜRK

Danışman
Prof.Dr. Özgen ÖZER

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

Tez Değerlendirme Kurulu Sayfası



Önsöz

Lisans yıllarında kıymetli hocalarımız sayesinde en sevdiğim derslerden biri olan Kozmetoloji'yi daha detaylı anlamak, mesleğime katkı sağlamak ve fark yaratmak için başlamış olduğum yüksek lisans programında, literatür taramaları sonucunda çeşitli yaraların iyileştirilmesinde kullanılabileceğini düşündüğüm Paramylon'u araştırmak ve *in situ* jel olarak tasarlayıp literatüre fayda sağlamayı hedefleyerek tez konumu seçtim. Yaptığım çalışmalar sonucunda hazırladığım tezimin faydalı bir çalışma olmasını umuyorum.

İzmir, Aralık 2023

Ecz. Kıvanç TÜRK

Özet

Bu tez çalışmasının hedefi yara iyileşmesi için Paramylon'un deride kullanımı için *in situ* jel formülasyonlarını hazırlamak ve kullanmaktır. Paramylon, beta-1,3-glukandır. Tek bir zarla çevrili olan Paramylon, fazlasıyla kristal yapıda ve kompleks fibriler depo karbonhidrat granülleri olarak görülür. Paramylon'un, antioksidan, antienflamatuar, rejeneratif, immünomodülasyon, nemlendirme ve gençleştirme gibi aktiviteleri çeşitli cilt hastalıklarında tedaviye destek olarak kullanımını sağlar. Paramylon, yara bölgesinde makrofaj fonksiyonlarını stimule ederek yara iyileşme sürecini destekler. *In situ* jel ilaç sistemleri 25 °C'de sıvıyken vücut sıvıları ile temas ettiğinde veya pH değişimleri sonucu jel haline gelir. Konvansiyonel formülasyonlara kıyasla *in situ* jellerin, kolay üretim, basit ve azaltılmış uygulama sıklığı, artan hasta uyumu gibi avantajları vardır. *In situ* jel, deride şişerek güçlü bir jel oluşturur ve aktif bileşenlerin deride kalma süresi uzar. *In situ* jel sistemi Paramylon'un deride kalma süresini bu sebeple de etkisini yükseltmek için tercih edilmiştir.

Sıcaklık artışıyla jelleşen *in situ* jel formülasyonları Poloksamer 188 ve Poloksamer 407 gibi polimerler kullanılarak soğuk metotla yapılmıştır. Final formülasyonunda paramylon konsantrasyonu %1 (a/a)dir. Bütün formülasyonların jelleşme sıcaklığı 29-34°C arasında olup bu da deriyle temas ettiğinde istenilen şekilde jelleşeceğini göstermiştir. Stabilité çalışmaları için paramylon içeren formülasyonlarda pH, renk, koku, görünüş, viskozite ve jelasyon zamanı parametreleri incelenmiştir. Formülasyonun pH ortalaması yaklaşık 6.7-6.8'dir ve ciltte kullanım için uygundur. Formülasyon renk,koku ve görünüş açısından stabil kalmıştır. Örnekler 4°C ve 25°C %60 relatif nemde stabilite kabinlerinde bekletilmiştir. Bu formülasyonların in vitro etkinlikleri ve antioksidan aktivitesi de incelenmiştir. Hazırlanan formülasyonlarda hücre canlılığı %70'in üzerinde çıkmıştır. Bu da biyoyumluluğun yüksek olduğunu göstermektedir. H₂O₂ ile indüklenen oksidatif stres sonucu azalarak %65'in altına düşen hücre canlılığı, paramylon içeren formülasyonla tekrar yükselerek %70'in üzerine çıkmıştır. Bu durum formülasyonun yara iyileşmesinde antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, paramylon yüklü *in situ* jeller deride yara iyileşmesinde ilerleyen dönemlerde etkili bir yöntem olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Paramylon; *In situ* jel; Yara İyileşmesi; Karakterizasyon; *In vitro* Etkinlik Çalışmaları.



Abstract

The aim of this thesis is to prepare and use *in situ* gel formulations for the use of Paramylon on the skin for wound healing. Paramylon is beta-1,3-glucan. Surrounded by a single membrane, Paramylon appears as highly crystalline and complex fibrillar storage carbohydrate granules. Paramylon's activities such as antioxidant, anti-inflammatory, regenerative, immunomodulation, moisturizing and rejuvenation enable its use as a support for the treatment of various skin diseases. Paramylon supports the wound healing process by stimulating macrophage functions in the wound area. With *in situ* gel drug systems, long-term drug release is achieved while maintaining stable plasma profiles. While these systems are liquid at 25 °C, they turn into gel when in contact with body fluids or as a result of pH changes. Compared to conventional formulations, *in situ* gels have advantages such as simple production, easy and reduced application, and increased patient compliance. *In situ* gel swells on the skin, forming a strong gel, and the duration of active ingredients on the skin is prolonged. The *in situ* gel system was preferred to increase the duration of Paramylon's stay on the skin and therefore its effect.

In situ gel formulations became gel with increasing temperature were made by cold method using polymers such as Poloxamer 188 and Poloxamer 407. Paramylon concentration in the final formulation is 1% (w/w). The gelation temperature of all formulations was observed between 29-34°C. This showed that it would gel as desired when in contact with the skin. For stability studies, pH, color, smell, appearance, viscosity and gelation time parameters were examined in formulations containing paramylon. The pH average of the formulation is approximately 6.7-6.8 and is suitable for use on the skin. The formulation remained stable in terms of color, smell and appearance. The samples were kept in stability cabinets at 4°C and 25°C and 60% relative humidity. In vitro activities and antioxidant activity of these formulations were also examined. Cell viability was over 70% in the prepared formulations. This shows that biocompatibility is high. Cell viability, which decreased to less than 65% as a result of H₂O₂-induced oxidative stress, increased again to over 70% with the formulation containing paramylon. This showed that the formulation has antioxidant activity in wound healing. As a result, paramylon-loaded *in situ* gels can be considered as an effective method for skin wound healing in the future.

Keywords: Paramylon; *In situ* gel; Wound Healing; Characterization; *In vitro* Efficacy Studies



İÇİNDEKİLER

Önsöz	III
Özet	IV
Abstract	VI
Şekiller	XII
Tablolar	XIII
Grafikler	XIV
Kısaltmalar	XV
1. GİRİŞ	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Deri Hakkında Genel Bilgiler	3
2.1.1 Derinin Tabakaları	3
2.1.1.1 Epidermis	4
2.1.1.1.1 Stratum korneum	4
2.1.1.1.2 Stratum lusidum	4
2.1.1.1.3 Stratum granulosum	4
2.1.1.1.4 Stratum spinosum	4
2.1.1.1.5 Stratum germinativum	4
2.1.1.2 Dermis	5
2.1.1.3 Hipodermis	5
2.2 Yara	5
2.3 Deride Yara İyileşmesi	5
2.4 <i>In situ</i> Jel Sistemler	6
2.5 <i>In situ</i> Jellerde Kullanılan Polimerler	6

2.6 Paramylon	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1 Kullanılan Maddeler ve Araçlar	10
3.2 Yöntem.....	12
3.2.1. <i>In situ</i> jellerin hazırlanması	12
3.2.2. Karakterizasyon çalışmaları.....	14
3.2.2.1. <i>In situ</i> Jel Formülasyonların Jelasyon Sıcaklığının Saptanması	14
3.2.2.2. <i>In situ</i> Jel Formülasyonların Akış Özelliklerinin Tayini	15
3.2.2.3. <i>In situ</i> Jel Formülasyonların Osilasyon Çalışmaları.....	15
3.2.2.4. <i>In situ</i> Jel Formülasyonların Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi	15
3.2.2.5. pH	16
3.2.2.6. Yapı Görüntüleme	16
3.2.2.6.1. Işık Mikroskobu	16
3.2.2.6.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu	16
3.2.2.7. Partikül Büyüklüğü	16
3.2.2.8. Temas Açısı.....	16
3.3. Paramylon'un Süspande Edilmesine Yönelik Testler	17
3.3.1. Çökme Hacmi	17
3.3.2. Çökme Hızı.....	17
3.3.3. Tekrar Disperse Olabilme.....	17
3.4. 3 Boyutlu Ambalaj Tasarımı	17
3.5. Stabilité	18
3.6. <i>In vitro</i> Etkinlik Çalışmaları	18
3.6.1. Biyouyumluluk Testi.....	18
3.6.2. Antioksidan Aktivite Tayini	19
3.6.3. Yara İyileştirme Testi.....	20

4. BULGULAR	21
4.1 Karakterizasyon çalışmaları	21
4.1.1 In situ Jel Formülasyonların Jelasyon Sıcaklığının Saptanması	21
4.1.2 <i>In situ</i> Jel Formülasyonların Akış Özelliklerinin Tayini.....	23
4.1.3 <i>In situ</i> Jel Formülasyonların Osilasyon Çalışmaları	24
4.1.4 <i>In situ</i> Jel Formülasyonların Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi.....	25
4.1.5 pH.....	25
4.1.6 Yapı Görüntüleme	26
4.1.6.1 Işık Mikroskobu.....	26
4.1.6.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu	26
4.1.7. Partikül Büyüklüğü	27
4.1.8. Temas Açısı	28
4.2. Paramylon'un Süspande Edilmesine Yönelik Testler	29
4.2.1 Çökme Hacmi	29
4.2.2. Çökme Hızı.....	29
4.2.3. Tekrar Disperse Olabilme.....	29
4.3. 3 Boyutlu Ambalaj Tasarımı	30
4.4. Stabilitate	31
4.4.1 pH:.....	31
4.4.2. Fiziksel Özellikler	32
4.4.3. Viskozite:.....	32
4.4.4 Jelasyon sıcaklığı:	32
4.5. <i>In vitro</i> Etkinlik Çalışmaları	33
4.5.1 Biyouyumluluk Testi.....	33
4.5.2. Antioksidan Aktivite Tayini	34
4.5.3. Yara İyileştirme Testi.....	34

5. TARTIŞMA	36
5.1 Karakterizasyon Çalışmaları	36
5.2. Paramylon'un Süspande Edilmesine Yönelik Çalışmalar	39
5.3. 3 Boyutlu Ambalaj Tasarımı	39
5.4. Stabilite	40
5.5. <i>In vitro</i> Etkinlik Çalışmaları	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
7. KAYNAKLAR.....	43
Teşekkür	49

Şekiller

Şekil 1: Derinin Yapısı (Chamcheu ve diğerleri, 2011)	3
Şekil 2: Paramylon içeren in situ jelin hazırlanması ve uygulanması	9
Şekil 3: 3 Boyutlu Ambalaj Tasarım Çalışmaları	18
Şekil 4: Hücre kültürüne Paramylon içeren in situ jel uygulanması	19
Şekil 5: Farklı sıcaklıklarda etken madde içeren ve içermeyen örnek görüntüleri	26
Şekil 6: Atomik Kuvvet Mikroskobu görüntüsü	27
Şekil 7: Temas açısı görüntüsü	28
Şekil 8: Çökme hacmi görüntüsü	29
Şekil 9: Ambalaj tasarımı	31
Şekil 10: Çizik testi sonuçları	35

Tablolar

Tablo 1: Farklı Polimer Denemeleri	14
Tablo 2: Farklı Oranlarda Poloksamer Karışımı Denemeleri.....	14
Tablo 3: Poloksamer ve Poloksamer-Paramylon karışımlarının TPA tablosu	25
Tablo 4: Poloksamer ve Poloksamer-Paramylon karışımlarının pH tablosu.....	25
Tablo 5: Paramylon içeren F5 formülasyonunun partikül büyüklüğü analiz sonuçları ..	27
Tablo 6: Paramylon içeren F5 formülasyonunun tekrar disperse olabilme analiz sonuçları	30
Tablo 7: Stabilite kabinlerinde bekletilen örneklerin pH değerleri	31
Tablo 8: Stabilite kabinlerinde bekletilen örneklerin ortalama viskozite değerleri.....	32
Tablo 9: Stabilite kabinlerinde bekletilen örneklerin ortalama jelasyon sıcaklığı değerleri.....	33

Grafikler

Grafik 1: Azalan Poloksamer 188 Konsantrasyonunun Jelleşme Sıcaklığı Üzerine Etkisi	21
Grafik 2: Azalan Poloksamer 407 Konsantrasyonunun Jelleşme Sıcaklığı Üzerine Etkisi	22
Grafik 3: Poloksamer Örneklerine Paramylon Eklenmesinin Jelleşme Sıcaklığı Üzerine Etkisi	22
Grafik 4: Paramylon İçeren ve İçermeyen F5 Formülasyonunun Viskozite Grafikleri .	23
Grafik 5: Paramylon İçeren ve İçermeyen F5 Formülasyonunun Osilasyon Grafikleri.	24
Grafik 6: Paramylon İçeren F5 Formülasyonunun Partikül Boyutu Dağılım Grafiği	28
Grafik 7: Paramylon İçeren F5 Formülasyonunun Tekrar Disperse Olabilme Partikül Boyutu Dağılım Grafiği	30
Grafik 8: 24-72 Saat Aralığında Farklı Grupların Hücre Canlılığında Meydana Gelen Değişimler	33
Grafik 9: Çeşitli Dozlarda Paramylon İçeren Formülasyonların Antioksidan Aktivite Sonucu Hücre Canlılığına Etkisi	34

Kısaltmalar

Kısaltma	Açıklama
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
Ca	Kalsiyum
CST	Kritik Çözelti Sıcaklığı
CO ₂	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DPBS	Dulbecco'nun fosfatlı tampon çözeltisi
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
FBS	Fetal Sığır Serumı
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
G'	Elastik Modül
G''	Viskoz Modül
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IL	İnterlökin
LCST	Düşük Kritik Çözelti Sıcaklığı
Mg	Magnezyum
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum]
N	Newton
Na	Sodyum
PBS	Fosfat tamponu
PMS	Fenazin metosülfat

PLX	Poloksamer
RA	Romatoid Artrit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SK	Stratum korneum
TPA	Tekstür Profil Analizi
UV	Ultra viyole
3B	3 Boyutlu

1. GİRİŞ

Deri, insan vücudunu çevreleyen, vücut kütleinin %10'una karşılık gelen en büyük organdır. Vücut neminin muhafazasında, sıcaklığının optimum tutulmasında kritik bir görevi bulunan derinin aynı zamanda en mühim işlevlerinden biri vücudu fiziksel, kimyasal, mikroorganizma ve alerjenlere karşı muhafaza eden bariyer yapısında olmasıdır. Deride, sıcaklık, basınç ve ağrı reseptörleri mevcuttur. Deri farklı katmanlardan meydana gelmektedir. Stratum corneum tabakası derinin en dış katmanı olup ölü hücrelerden oluşur ve bariyer rol oynar.

Epidermal bariyerin bir kaza, hastalık vb. sebeplerle bütünlüğünün bozulması yara oluşumuna yol açar. Akut yaralara ek olarak diyabetik ayak yarası, bacak ülserleri gibi zorlu iyileşme süreçlerine sahip kronik yaralar da vardır. Kronik yaralar, hastanın yaşam kalitesinde önemli rahatsızlıklara sebep olmanın yanında tedavisi de ekonomik problemlere yol açar. Başta enfeksiyonlar ve diğer komplikasyonların meydana gelmesine ve eşlik eden çeşitli hastalıklara sebep olurlar. Hem yaraların birincil etkisi hem de sebep oldukları eşlik eden hastalıklar düşünüldüğünde yaraların iyileştirilmesinde kullanılan ürünler fazlasıyla büyük bir kitleye hitap etmektedir. İnsan vücudunda normal bir biyolojik süreç olan yara iyileşmesi dört aşamada sağlanır. Bunlar; hemostaz, yangı, proliferasyon ve yeniden şekillenme. Bir yaranın başarılı bir biçimde iyileşmesi için dört fazın da uygun düzen ve süre içinde meydana gelmesi gerekir. Pek çok etmen, bu sürecin bir veya birden çok basamağını engelleyebilir, dolayısıyla uygunsuz veya bozulmuş yara iyileşmesine sebep olabilir. Bu faktörler enfeksiyon durumu, yaş, cinsiyet, stres, diyabet, obezite, ilaçlar, alkol ve sigara kullanımı ve beslenme olabilir.

Doku onarımını ve iyileşmeyi destekleyen hücresel ve moleküler mekanizmalar hala tam olarak belirlenemiştir ve güncel tedaviler kısıtlıdır. Travma, cerrahi müdahale, akut veya kronik hastalık sonucu oluşan yaraların iyileşme süreci tedavi planlanmasında çok önemli bir konudur. Vücudun doğal onarım mekanizmalarının iyileştirilmesine yönelik klinik stratejilerin geliştirilmesi, onarım ve yenilenmenin temel biyolojisinin tam olarak anlaşılmasına bağlıdır.

In situ jel, son zamanlarda topikal uygulamalarda tercih edilen yeni bir formülasyon tipidir. Deriye uygulanan çözeltilere kıyasla *in situ* jellerin viskozitesi daha yüksektir.

Deriye teması ile polimer yapısını farklılaştırarak jel haline gelmektedirler. O yüzden, *in situ* jeller sadece deri ve etken madde arasındaki etkileşim süresini uzatmaz, derinin etken maddeyle etkileşiminin ağır ve devamlı bir biçimde gerçekleşmesini de sağlar. Bu nedenle, *in situ* jeller özellikle kronik kullanımın gerektiği durumlarda tercih edilebilir.

Bir beta glukon olan Paramylon'un yara yatağındaki fagositik hücreleri ve özellikle makrofaj fonksiyonlarını modüle ederek yara iyileşme sürecini uyardığı belirtilmiştir. Paramylon, doğal immünolojik sisteme ait hücrelerin fonksiyonlarını modüle ederek ve fagositik hücreleri yara bölgesine alarak ikincil yara enfeksiyonu riskinin azaltılmasına da katkıda bulunur.

Paramylon'un, antioksidan, antienflamatuar, rejeneratif, immünomodülasyon, nemlendirme ve gençleştirme gibi aktiviteleri, çeşitli cilt hastalıklarının ve komplikasyonlarının tedavisine yardımcı olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Ayrıca paramylon, anti-enfektif özelliklere sahiptir. Geniş bir gram-pozitif ve gram-negatif bakteri spektrumuna karşı potansiyel antibakteriyel aktivite sergiler. Bu nedenle paramylon geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip stabilitesi yüksek uygun bir yara iyileştirme bileşeni olabilir.

Bu tez çalışmasında bilinen etkileri ile yara tedavisinde potansiyel olarak kullanılabilecek paramylon içeren *in situ* jel formülasyonu geliştirilmesi amaçlanmıştır. Poloxamer 188 ve Poloxamer 407 isimli polimerler kullanılarak ilk olarak paramylon içeren süspansiyon formülasyonu hazırlanmış ve deri ile temas ettiğinde sıcaklık artışıyla jel haline gelen formülasyon oluşturulmuştur.

Formülasyonun güvenilirlik ve etkinliğinin belirlenmesi için biyoyumluluk testi, antioksidan aktivite, yara iyileştirme testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testlerin sonuçları etken madde olarak paramylon içeren formülasyonun tedavisi zor ve masraflı olan yara iyileşmesinde potansiyel bir ürün olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışma ile potansiyel olarak kullanılabilecek bir formülasyon geliştirilmiş olup hastaların yaşam kalitesinin artırılması ve tedavi masraflarının azaltılması amaçlanmıştır.

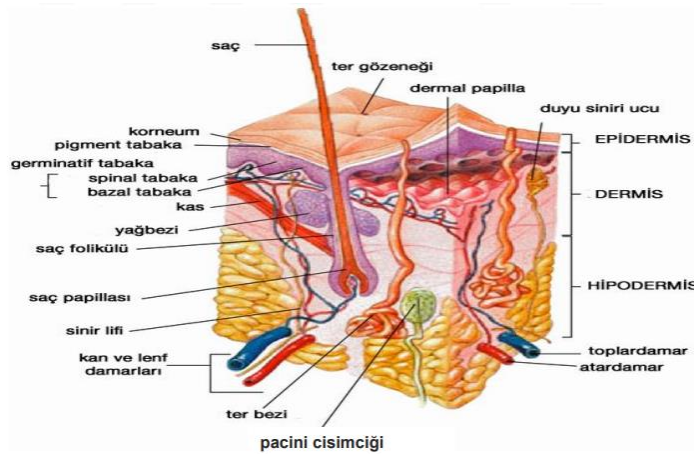
2.GENEL BİLGİLER

2.1 Deri Hakkında Genel Bilgiler

Etken maddelerin deri yoluyla geçişini lokal veya sistemik etki için kısıtlayan en önemli etken derinin yapısıdır. O yüzden formülasyon geliştirilirken derinin yapısı ve özellikleri dikkatle düşünülmelidir. Deri, vücudun en büyük organ sistemidir. Yaklaşık 1,8 - 2 m² yüzey alanı ve 9 kg ağırlığıyla vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını oluşturur. Kalınlığı yaklaşık 0,5 - 3 mm'dir. Harekete izin verecek kadar elastik ve uyaranları algılayacak kadar incedir. Vücudu fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal dış etmenlere karşı muhafaza eder. Vücut ısının muhafazasında termostat görevi görür. Kan basıncını kontrol eder. UV ışınlarına karşı da sağlam bir muhafaza görevi görür. Cilt hafif asidiktir. pH'ı 5,2 ile 5,6 arasındadır (Acartürk ve diğerleri, 2007; Arslan Azizoğlu, 2014; Gürsoy, 2002).

2.1.1 Derinin Tabakaları

Deri, üç tabakadan oluşur. En dıştaki tabaka, dış ortamla bağlantı halinde olan epidermis, bağ dokusu ögelerinden meydana gelen, esneklik ve direnç özelliklerini veren dermis ve bu iki tabaka arasında "dermo-epidermal komponent" olarak adlandırılan farklılaşmış bir kısımdır. Dermo-epidermal katman, üstündeki epidermise fiziksel destek verir ve biraz da dermis ile epidermis arasında hücrelere ve büyük moleküllere karşı bir bariyer vazifesi görür. Dermisin altında deri altı doku olarak da bilinen, yağ içeriği fazla ve altındaki dokularla irtibatı sağlayan hipodermis bulunur (Şekil 1) (Chamcheu ve diğerleri, 2011).



Şekil 1: Derinin Yapısı (Chamcheu ve diğerleri, 2011)

2.1.1.1 Epidermis

Derinin en dışındaki tabakadır. Kan damarları ve lenfatik sistem bulunmaz. Kalınlığı vücudun farklı bölgelerinde 150-180 µm arasındadır. Morfolojik görüntü ve hücre işlevleri açısından beş farklı tabakadan oluşur (Menon, 2002). Bunlar, Stratum korneum (Boynuzsu Tabaka), Stratum lusidum, Stratum granulosum (Granüler Tabaka), Stratum spinosum (Diken, Sivri Uç Tabakası), Stratum germinativum (Bazal Tabaka)'dır.

2.1.1.1.1 Stratum korneum

Epiderminin en dışta bulunan tabakasıdır ve kalınlığı 6-15 µm'dir. 15-20 kat ölü, yassı, uzun ve bütünüyle keratinize korneosit bulunur. 14 günde bir yenilenme özelliği vardır. Lipitlerden ve proteinlerden oluşur. Stratum corneum, ilaç moleküllerinin deriden geçmesi için ana engeli meydana getirir. Protein tuğlaları ve lipid harcından oluşan sistemli olarak örülmüş duvar gibi tanımlanır. İçerdiği lipid miktarı ve türü vücuttaki bölgesine göre farklılık gösterir ve bu da geçirgenliğin farklı olmasının en önemli etkenlerindendir. (Barry, 1991).

2.1.1.1.2 Stratum lusidum

Son derece düzleştirilmiş eozinofilik hücreler oluşturduğu ince bir tabakadır. Yalnızca derinin çok kalın olduğu belirli bölgelerde görülebilir. (Örn: Avuç içi ve ayak tabanı)

2.1.1.1.3 Stratum granulosum

Üç veya beş hücre kalınlığında basık hücrelerden meydana gelir. Keratinizasyonun ilk belirtileri görülür. Çekirdek ayrışması bu katmanda başlasa da, hücrelerin hala çekirdekleri vardır. Canlı epiderminin en dış sınırı bu tabakadır.

2.1.1.1.4 Stratum spinosum

Bu katmanda dezmozom olarak adlandırılan bağlantı üniteleri bol miktarda bulunur. Karakteristik mikroskop görünümü, hücre yüzeyinde fazla miktarda dikenli yapının görünümüdür. Lipitçe zengin katmanlı bölümler içerir.

2.1.1.1.5 Stratum germinativum

En derin epiderminin tabakasıdır. Öteki katmanlara kıyasla daha çabuk prolifer olabilen hücrelerden oluşur ve bu bitişik hücreler cilt yüzeyine hareket ederek başkalaşarak diğer katmanları oluşturur. Hemidesmozom olarak adlandırılan bağlantı üniteleri dermise

bağlıdır. Bu tabaka dermis-epidermis sınırırır. Deri pigmentasyonunu sağlayan melanositler de Stratum germinativum'da bulunur (Arslan Azizoglu, 2014).

2.1.1.2 Dermis

Dermisin çoğu, yüksek su bağlama kapasitesine sahip polisakkaritler ve proteinlerden oluşur. Dermiste, 3 önemli protein fazla miktarda bulunur. Bunlar güç sağlayan kolajen, retikülin ve elastikiyet sağlayan elastindir. Fibroblastlar, mast hücreleri ve histiyositler dermisin hücresel kısmını meydana getirir. Dermis kalınlığı, vücudun farklı bölgelerinde farklıdır. Göz kapaklarında 0,3 mm olarak görülürken sırtta 3 mm civarındadır. Dermis ayrıca birçok özel hücre ve yapıdan oluşur. Kıl kökleri, ekrin ve apokrin ter bezleri de bu tabakadadır. Dokunma ve basınç duyularını sağlayan farklılaşmış sinir hücrelerini içerir. Dermis aynı zamanda damar içeriği açısından da zengindir (Acartürk ve diğerleri, 2007).

2.1.1.3 Hipodermis

Dermisin altındaki tabakadır. Fazla miktarda yağ meydana getiren ve biriktiren hücrelerden oluşur. Kollajen sayesinde cilde elastikiyet ve yalıtım sağlar. Bununla birlikte ana damarlar da hipodermis tabakasında yer alır.

2.2 Yara

Yara, vücuttaki normal bütünlüğün herhangi bir etken tarafından fiziksel hasara neden olarak bozulmasıdır. Yara tipleri; akut yaralar ve kronik yaralar olarak ikiye ayrılır. Akut yaralar; genellikle travma ile olur, nedeni geçicidir, beklenenden kısa zamanda onarılır, deri onarımı önleyen faktörlerin sayısı düşüktür ve deri onarımı sürekli. Kronik yaralar ise; iyileşmez veya uzun sürede iyileşir, yara oluşumuna neden olan faktör sürekli, deri onarımını önleyen ve onarım zamanını arttıran çeşitli etmenler vardır, diyabetik ayak, venöz ülser, arteriyel ülser, kansere bağlı ülserler, immünolojik nedenli piyoderma gangrenozum bu gruba girer (Sivrikaya ve Erdem, 2019).

2.3 Deride Yara İyileşmesi

Vücudun tüm doku ve organlarında gerçekleşir. İyileşme prosesi, immünolojik ve biyolojik sistemlerin beraber çalışmasıyla meydana gelir (Attinger, 2006). Akut ve kronik yaralarda esas aşamaları aynıyken, yara iyileşmesinde rol oynayan bileşenler arasındaki süre ve etkileşimler aynı olmayabilir. Doku hasarının tetiklediği akut doku onarım süreçleri birbiriyle bağlantılı dört fazdan oluşur. Bunlar; Yaralanmanın ardından meydana

gelen hemostaz ve koagülasyon fazı, daha sonra influmatuvar faz, sonrasında başlayan ve yara iyileşmesinin çoğunu oluşturan çoğalma fazı ve bir yıl ya da daha uzun süren skar dokusu oluşumuyla sonuçlanan yeniden şekillenme fazıdır (Diegelmann ve Evans, 2004).

2.4 *In situ* Jel Sistemler

Sıcaklığın yükselmesinden etkilenen polimerler, *in situ* sistemlerin hazırlanmasında fazlasıyla tercih edilir. Bu formülasyonda ideal kritik sıcaklık, ortam sıcaklığı yani fizyolojik sıcaklıktır. Böylelikle herhangi bir kimyasal reaksiyona ya da vücut dışında herhangi bir dış ısı kaynağına ihtiyaç duymadan basit bir mekanizma ile faz geçişi gerçekleşebilir. Sıcaklığa duyarlı *in situ* jel sisteminde en yaygın tercih edilen polimerler Poloxamer®, xyloglucan ve poly(N-isoprylacrylamide) türevleridir. Son yıllarda hasta uyumu fazla olan dozaj formlarına talep yükselmiştir. Bu talep sonucunda *in situ* jel sistemler son yıllarda büyük önem elde etmiştir. *In situ* jel oluşturan sistemler, kararlı yapılarını korurken uzun süreli etken madde salınımı elde etmeyi sağlarlar. Bu sistemler oda sıcaklığında sıvı haldeyken vücut sıvıları ile temas ettiğinde veya pH değişimleri sonucu jel formuna dönüşürler. Formülasyonlar, sıcaklık, pH veya katyon kaynaklı jel haline gelirler. Konvansiyonel kontrollü salım formülasyonları ile karşılaştırıldığında *in situ* jel sistemleri, kolay üretim süreci, basit uygulama, azaltılmış uygulama sayısı, hasta uyumu artışı ve kullanım rahatlığı gibi avantajlara sahiptir. *In situ* jel sistemleri bir tür mukoadhezif sistem olmasıyla beraber çok kuvvetli jellerin göre sıvı formda adsorpsiyon bölgesine rahatlıkla uygulanabilmektedir. Etken madde, emilim alanında şişer, kuvvetli bir jel oluşturur ve etken maddenin kalma zamanını uzatır. *In situ* jellerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılır. *In situ* jel hazırlamada, pH ve/veya sıcaklık değişimi ve iyonik çapraz bağlanma gibi değişik etkenlerin biri ya da kombinasyonu ile elde edilebilir (Srividya, Cardoza ve Amin, 2001). *In situ* jeller, oral, oküler, nazal, rektal, vajinal, intraperitoneal gibi farklı yollarla uygulanabilirler.

2.5 *In situ* Jellerde Kullanılan Polimerler

Isıya duyarlı dönüşüm sergileyen farklı farklı polimerler vardır. Kaynaklarına göre iki ana gruba ayrılabilirler. Bunlar, doğal polimerler ve sentetik polimerlerdir. Selüloz, kitosan, ksiloglucan, jelatin gibi polimerler ve bunların türevleri doğal polimerlere örnek olarak verilebilir. İdeal bir ısıya duyarlı sistem, oda sıcaklığında akışkan özellik gösteren sıvı

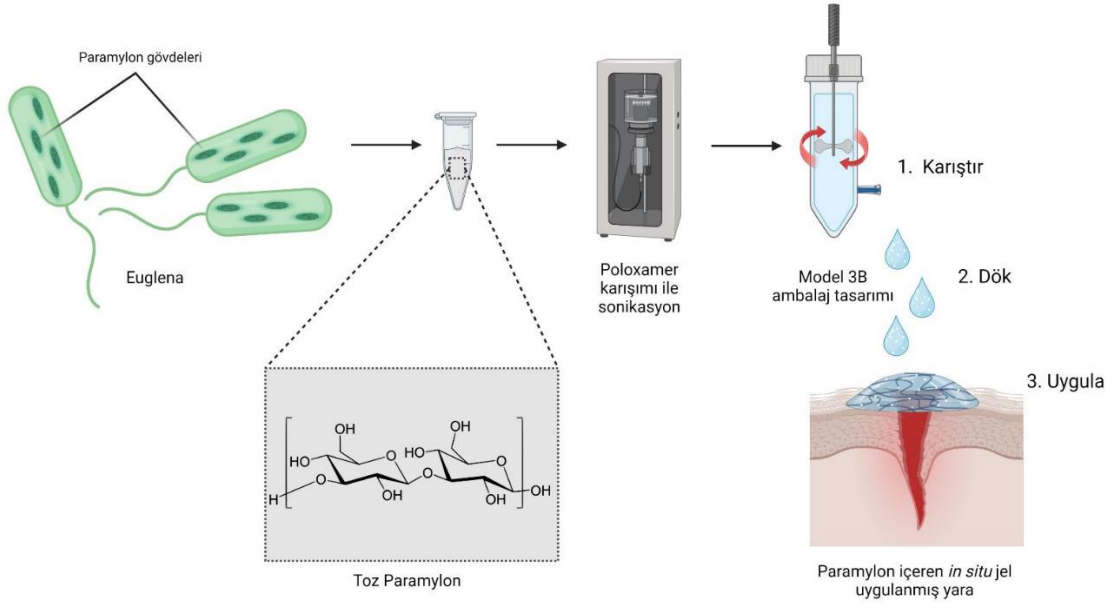
olmalı, ancak vücuda uygulanmasının ardından jel formuna geçmelidir (Ruel-Gariépy ve Leroux, 2004). Bu formülasyonlarda kullanılan polimer çözeltisinin faz ayrışması için görülen sıcaklık, kritik çözelti sıcaklığı olarak adlandırılır. (CST). Kritik çözelti sıcaklığı altında (LCST), polimerler çözünürken sıcaklık LCST değerinin üzerine çıktığında jel oluşumu başlar. Hidrofobik ve çözünür olmayan hale gelirler. Polimer seviyesindeki yükselişle birlikte, hidrofobik polimer etkileşimleri daha çabuk olduğundan sol-jel geçiş sıcaklığı düşer (Jeong, Choi, Bae, Zentner ve Kim, 1999). Poloksamer 407'nin sulu çözeltileri, formülasyon geliştirilmesinde tercih edilen ısıya duyarlı özellikler içerir. Isıya duyarlı jelleşme tersinirdir ve sol-jel geçiş sıcaklığı ile ifade edilir. Bu sıcaklıktan düşük sıcaklıklarda formülasyon çözelti halindedir, bu sıcaklık değerinin üzerinde jel haline gelir. Sıcaklık yükseldikçe, Poloksamer 407 molekülleri miseller halinde toplanır. Bu miselleşme, hidrofobik propilen oksit bloklarının dehidrasyonu nedeniyle oluşur ve jelleşme sürecini başlatır (Dumortier, El Kateb, Sahli, Kedjar, Boulliat ve Chaumeil, 2006). Miseller, dehidrate bir poli(propilen oksit) çekirdeği ve hidratlanmış, şişen bir poli(etilen oksit) dış kabuğu olan küre şeklindedir. Yeterli polimer içeren numunelerde, bu miselleşmeyi jelleşme izler. Jelleşme, misellerin paketlenmesi olarak düşünülebilir (Juhasz, Lenaerts, Raymond ve Ong, 1989). Poloksamer 188, triblok kopolimerlerin çok dağılımlı bir karışımıdır. Her molekülün merkezinde hidrofobik poli(propilen oksit) (PPO) bloğu bulunur ve iki yanında 2 hidrofilik poli(etilen oksit) (PEO) blok bulunur. Geleneksel olarak ilaç endüstrisinde köpük giderici ajan, deterjan, dispersiyon ajanı, emülsifiye edici ajan, çözündürücü ajan ve ilaç dağıtım araçlarında kullanılmaktadır.

2.6 Paramylon

Beta-1,3-glukanlar doğada yaygın olarak bulunur. Bitki hücre duvarı sentezinde önemli bir rol alırlar. Beta-1,3-glukan, tek bir zarla çevrili, oldukça kristalli ve kompleks fibriler depo karbonhidrat granülleri olarak sentezlenir. Elektron mikroskobunda, bu zar bir lipid çift tabakasından oluşan normal bir biyomembran gibi görünmektedir (Kiss, Roberts, Brown ve Triemer, 1988). Paramylon, *Euglena* sp.'den elde edilen lineer bir polisakkarit olan β -1,3-glukandır (Kiss, Roberts, Brown ve Triemer, 1988). Özellikle, *Euglena gracilis*'ten elde edilen Paramylon'un sülfatlanmış türevleri, anti HIV (insan immün yetmezlik virüsü) aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Koizumi, Sakagami, Utsumi, Fujinaga, Takeda, Asano, Yamamoto, 1993). Paramylon, lineer β -1,3-glukandan oluşan

bir polisakkarittir. *Euglena gracilis*'ten elde edilir. Paramylon, FDA tarafından bir gıda katkı maddesi olarak onaylanmıştır. Paramylonun oral uygulamasının, bir antioksidan mekanizma yoluyla sıçanlarda CCl₄'ün neden olduğu akut karaciğer hasarına karşı koruyabileceği keşfedilmiştir. Paramylon, artritin klinik belirtileri ve ayrıca lenfatik dokulardaki IL-17, IL-6 ve IFN- γ ve RA'nın rahatlaması üzerindeki etkisini belirlemek için incelenmiştir. Bu araştırmalar, paramylonun ümit verici bir antioksidan ve antiinflamatuvar materyal olduğunu göstermiştir (Yasuda, Ogushi, Nakashima, Nakano, ve Suzuki, 2018).

Bu çalışmada *Euglena gracilis*'ten elde edilen Paramylon kullanılarak ısıya duyarlı bir *in situ* jel formülasyonu geliştirilmiştir. Paramylon yara iyi edici ve antioksidan özelliklerinin yanı sıra elde edilmesinin diğer beta-glukan türevlerine göre daha kolay, ekonomik ve çevreye duyarlı olması sebebiyle seçilmiştir. Bu madde suda ve diğer solvanlarda çözünürlük problemleri göstermektedir. Bu nedenle soğukta sonikasyon uygulanarak, düşük sıcaklıkta akışkan yapıdaki polimer karışımı ile homojen olarak karıştırılması sağlanmıştır. Isıya duyarlı *in situ* sistem kullanılmasının bir diğer sebebi ise yaralı deriye uygulama kolaylığı sağlamaktır. Uygulama esnasında akışkan yapıda olan formülasyonun yaralı deriye kolayca uygulanabileceği, sistemin deri sıcaklığı olan 32°C'de jelleşmesiyle kalış süresinin artırılacağı düşünülmektedir. Tarafımızca yapılan literatür taramalarında Paramylon kullanılarak üretilen bir *in situ* sisteme rastlanılmaması çalışmamızın özgün yanlarından birini oluşturmaktadır. Formülasyonun saklanması süresince meydana gelen çökeltinin hasta uygulamadan önce hızlı ve homojen bir şekilde tekrar dağıtılabilmesi için son ambalaj içerisinde karıştırmayı ve sonrasında hastanın yaralı deriye uygulama yapmasını sağlayacak prototip ambalaj tasarımı üç boyutlu (3B) yazıcı ile gerçekleştirilmiştir. Karıştır, dök, uygula şeklindeki üç adımla, hastaların, formülasyonu kolayca yaralı bölgeye uygulayabilmesini hedeflediğimiz çalışmamızın bir diğer özgün yönü ise bu yenilikçi ambalaj tasarımıdır. Çalışmanın grafiksel özeti Şekil 2'de gösterilmektedir.



Şekil 2: Paramylon içeren *in situ* jelin hazırlanması ve uygulanması

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Maddeler ve Araçlar

Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Gerekçesi
Poloxamer 407	BASF	Formülasyon Çalışmaları
Poloxamer 188	BASF	Formülasyon Çalışmaları
Paramylon	Sigma Aldrich	Yara İyileştirici Etken Madde
Ultra Saf Su	Sartorius Arium 61.316 Ters Osmoz Sistemi Aurium Pro Ultra Saf Su Sistemi	Formülasyon Çalışmaları
NaOH	MERCK	pH Ayarlama
HCL	MERCK	pH Ayarlama
DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)	Sigma Aldrich	Hücre Kültürü
MTS	Promega	Hücre Kültürü
Fenazin metosülfat (PMS)	Sigma Aldrich	Hücre Kültürü

Cihaz	Marka/Model	Kullanım Amacı
pH Metre	Thermo Scientific™ Orion Star™ A121 Portable pH Meter	Formülasyonun pH Ölçümü
Ultra Saf Su Cihazı	Sartorius Arium 61.316 Ters Osmoz Sistemi Aurium Pro Ultra Saf Su Sistemi	Formülasyon Çalışmaları
Manyetik Karıştırıcı	ISOLAB 613.01.001	Formülasyon Çalışmaları
Hassas Terazı	Mettler Toledo New Classic ML204/01	Tartım

Su Banyosu	DAIHAN - Digital General Purpose Water Bath - WB Series	Formülasyon Çalışmaları
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Thermo Scientific™ Cimarec™ Telesystem Multipoint Stirrers	Formülasyon Çalışmaları
Sonikatör	Bandelin SONOPULS HD 2070.2 Sonikatör	Formülasyon Çalışmaları
Reometre	TA Instruments HR-1 Discovery Hybrid Rheometer	Karakterizasyon Çalışmaları
Santrifüj	SIGMA 2-16KL	Formülasyon Çalışmaları
Partikül Büyüklüğü	Malvern Zetasizer	Formülasyon Çalışmaları
Temas Açısı	Biolin Scientific Attension Theta Lite	Stabilite Çalışmaları
Stabilite Kabinleri	Nuve	Stabilite Çalışmaları
TPA	TA.XT Plus Texture Analyser	Karakterizasyon Çalışmaları
Mikroskop	Zeiss Primo Star Binocular Microscope	Karakterizasyon Çalışmaları
Hücre Kültürü	Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM	Stabilite Çalışmaları
Spektrofotometre	Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo	Stabilite Çalışmalar
Hücre Kültürü	GraphPad Prism 5.03 for Windows Prism 5.03	İstatistiksel Analiz
3B Yazıcı	Ultimaker S3	Ambalaj Çalışmaları
Atomik Kuvvet Mikroskobu(AFM)	Bruker Dimension Edge	Karakterizasyon Çalışmaları
Tensiometre	Biolin Scientific, Attension Theta Lite	Temas açıcı ölçümü

3.2 Yöntem

3.2.1. *In situ* jellerin hazırlanması

Farklı polimerler ve farklı oranlar ile hazırlanan formülasyonlar Tablo 1’de gösterilmektedir. Çıkan sonuçlar ve literatür taramaları neticesinde formülasyonun Poloxamer 407 ve Poloxamer 188 karışımı ile hazırlanmasına karar verildi. Poloksamer karışımıyla istenilen jelleşme sıcaklığı elde edildi. Formülasyonları hazırlarken önce distile su +4°C’de 1 gün bekletildi. Ardından belirlenen oranlarda tartılan Poloxamer 407 ve Poloxamer 188 soğuk distile suya eklenip Vortex ile karıştırıldı. Tekrardan buzdolabına koyulan örneklerdeki polimerler çözündükten sonra Paramylon eklendi. Sonikatörde 10 dakika 5 cycle sonike edildi. Bu işlem için VS 70 T prob’u kullanıldı. Hazırlanan örnekler +4°C buzdolabında saklandı. F1,F2 ve F3; F4 ve F5’in jelleştiği sıcaklıklarda sıvı karakter gösterdi. İstedığımız *in situ* jel özelliği sadece F4 ve F5 gösterdiği için bu örnekler seçildi. F4 ve F5 hem paramylon içeren hem de paramylon içermeyen şekilde hazırlandı (Tablo 2).

Polimer	Oran	Sıcaklık	Sonuç
Carbopol	0.50%	25°C	Jel
Carbopol	1.50%	25°C	Jel
Carbopol	2%	25°C	Jel
Carbopol	2.50%	25°C	Jel
Methocel K 100 M (HPMC)	1%	25°C	Sıvı
Methocel K 100 M (HPMC)	1.50%	25°C	Jel
Kollidon VA 64	5%	25°C	Sıvı
Kollidon VA 64	10%	25°C	Sıvı
Kollidon VA 64	5%	32°C	Sıvı
Kollidon VA 64	10%	32°C	Sıvı
Kollicoat IR	5%	25°C	Sıvı
Kollicoat IR	10%	25°C	Sıvı
Kollicoat IR	5%	32°C	Sıvı
Kollicoat IR	10%	32°C	Sıvı

Kolliwax S	3%	25°C	Sıvı üstünde kütle oluştu
Kolliwax S	5%	25°C	Sıvı üstünde kütle oluştu
Kolliphor P188 Geismar	10%	25°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	15%	25°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	10%	32°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	15%	32°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	10%	37°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	15%	37°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	20%	25°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	25%	25°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	20%	32°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	25%	32°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	30%	25°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	35%	25°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	40%	25°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	30%	32°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	35%	32°C	Sıvı
Kolliphor P188 Geismar	40%	32°C	Sıvı
Poloxamer 407	13%	25°C	Sıvı
Poloxamer 407	15%	25°C	Sıvı
Poloxamer 407	18%	25°C	Jel
Poloxamer 407	13%	32°C	Sıvı
Poloxamer 407	15%	32°C	Kısmi Jel
Poloxamer 407	18%	32°C	Jel
Poloxamer 407	15%	37°C	Jel
Poloxamer 407	18%	37°C	Jel
Poloxamer 407	16%	25°C	Sıvı
Poloxamer 407	16.50%	25°C	Kısmi Jel
Poloxamer 407	16%	32°C	Jel
Poloxamer 407	16.50%	32°C	Jel

Tablo 1: Farklı Polimer Denemeleri

	% PLX 407	% PLX 188	% Paramylon
F1	20	15	-
F2	20	10	-
F3	20	5	-
F4	18	10	-
F5	15	10	-
F4 + Paramylon	18	10	1
F5 + Paramylon	15	10	1

Tablo 2: Farklı Oranlarda Poloksamer Karışımı Denemeleri

3.2.2. Karakterizasyon çalışmaları

3.2.2.1. In situ Jel Formülasyonların Jelasyon Sıcaklığının Saptanması

Paramylon içeren ve içermeyen formülasyonlarının jelasyon sıcaklığının saptanması için Thermo Scientific Haake Mars stres/hız kontrollü reometre ile çalışılmıştır. (TA Instruments HR-1 Discovery Hybrid Rheometer). Analiz, 35 mm çapındaki çelik prob 0.1 mm sabit aralıkla kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm esnasında sıcaklık dakikada 2°C yükseltilerek 20-50°C aralığında değiştirilecek ve örneklerin bu sıcaklıklar arasındaki viskozite (Pa.s), elastik modül (G'), viskoz modül (G'') değerlerindeki değişimi izlenmiştir. Jelasyon sıcaklığının belirlenmesinde viskozitenin belirgin olarak değiştiği bölge ve $G' \gg G''$ olduğu değer dikkate alınacaktır. Her örnek için çalışma en az üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.2.2. *In situ* Jel Formülasyonların Akış Özelliklerinin Tayini

Jel formülasyonların akış özellikleri 25°C ve 32°C’de reometre cihazı (TA Instruments HR-1 Discovery Hybrid Rheometer) ile gerçekleştirildi. Ölçümler, 40 mm çapındaki çelik prob, 0.3 mm sabit aralık kullanılarak ve kayma oranı 10-2000 1/s arasında değiştirilerek yapıldı. Kayma oranı bu değerler arasında değişirken 40 adet kayma gerilimi ölçümü alındı. Her örnek için çalışma en az üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.2.3. *In situ* Jel Formülasyonların Osilasyon Çalışmaları

Jel formülasyonları reometre cihazı ile reolojik açıdan incelendi. Çalışmalar, 40 mm çapındaki çelik prob, 0.3 mm sabit aralık kullanılarak 32°C’de gerçekleştirildi. Hazırlanan formülasyonların elastik modül (G') ve viskoz modülü (G'') tespit edildi. Her örnek için çalışma en az üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.2.4. *In situ* Jel Formülasyonların Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Software kontrollü penetrometre (TA-XT Plus, Stable Micro System, UK) ile gerçekleştirilmesi planlanan çalışma sonucunda elde edilecek kuvvet-zaman grafiklerinden jel formülasyonunun sertliği, sıkıştırılabilirliği, adezifliği, kohezifliği ve elastikliği saptandı.

Test Parametreleri

- Prob: Perspex (10 mm çap)
- Test öncesi probun hızı: 2.0 mm/s
- Test esnasında probun hızı: 2.0 mm/s
- Test sonrası probun hızı: 2.0 mm/s
- Hedef modu: Mesafe
- Probun filme batma mesafesi: 7.0 mm
- Probun ikinci batmadan önce bekleme süresi: 15.0 s
- Teste başlamak için probun hissetmesi gereken kuvvet: 0.005 N

3.2.2.5. pH

Her ölçüm öncesi pH metre pH'ı 4.01 , 7.0 ve 10.01 olan standart tampon çözeltiler kullanılarak kalibre edilmiştir. Kalibrasyon işleminden sonra Paramylon içeren ve içermeyen formülasyonlardan bir miktar behere alınarak 3 tekrar olacak şekilde pH ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pH değerleri kaydedilmiştir.

3.2.2.6. Yapı Görüntüleme

3.2.2.6.1. Işık Mikroskobu

Zeiss Primo Star ışık mikroskobu ile 25 °C ve 32 °C sıcaklıklarda mikroskop görüntülemesi yapılmıştır.

3.2.2.6.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu

Paramylon katı partiküllerinin *in situ* jel içerisindeki dağılımlarının homojenitesini görsel olarak incelemek amacıyla atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 100 µL Paramylon içeren formülasyon mikroskop camı üzerinde, laminar hava akımı altında kurutulmuştur. AFM analizi OTESPA-R3 (Bruker, USA) probu kullanılarak, tapping mode'da, 20x20 µm'lik alan taranarak, 25°C'de ve 1 Hz tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.7. Partikül Büyüklüğü

Paramylon içeren F5 formülasyonunun partikül büyüklüğü dinamik lazer ışık saçılımı yöntemiyle Malvern ZetaSizer Nano ZS kullanılarak 25°C'de belirlenmiştir.

3.2.2.8. Temas Açısı

Paramylon'un Poloxamer karışımı ile ıslanabilirliğinin analiz edilmesi amacıyla sessile drop tekniği kullanılarak temas açısının ölçülmüştür. Sessile drop tekniği şu işlemlerden oluşur içerir. Damla oluşturma; incelenen sıvı, bir iğne veya pipet ucu yardımıyla bir yüzeye bırakılır. Damla şeklinde durma; damla, yerçekimi ve yüzey gerilimi etkisiyle belirli bir şekilde yüzey üzerinde durur. Görüntüleme ve ölçüm; damlanın şekli ve konumu, genellikle bir kameralı sistem yardımıyla görüntülenir. Bu görüntüler, temas açısı gibi çeşitli yüzey özelliklerini belirlemek için kullanılır.

3.3. Paramylon'un Süspande Edilmesine Yönelik Testler

3.3.1. Çökme Hacmi

Paramylon içeren formülasyon hazırlandıktan hemen sonra 10 mL hacimdeki mezüre aktarılmıştır. Başlangıç hacmi (h_0) ve 1 gün bekletildikten sonraki çökelti hacminin (h_u) birbirine oranlanmasıyla çökme hacmi belirlenmiştir (Eşitlik 1). Testler 25°C'de ve formülasyon süspansiyon halindeyken yapılmıştır.

$$F = \frac{h_u}{h_0}$$

Eşitlik 1. Çökme hacmi formülü

F= Çökme hacmi

h_u = Çökelti yüksekliği

h_0 = Başlangıç yüksekliği

3.3.2. Çökme Hızı

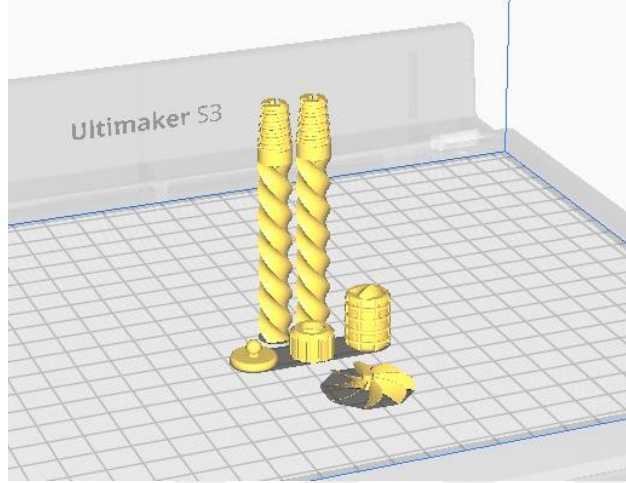
Hazırlanan taze örnekte Paramylon'un çökmesinden dolayı faz ayrışmasının meydana geldiği süre belirlenmiştir.

3.3.3. Tekrar Disperse Olabilme

3B yazıcı ile üretilen ambalaj içerisinde saklanan formülasyonda Paramylon'un çökmesine izin verildikten sonra ambalaj dahilinde bulunan mekanizma ile formülasyon karıştırılmış ve partikül boyutu analizi yapılmıştır. Sonuçlar taze hazırlanan örnek ile karşılaştırılmıştır.

3.4. 3 Boyutlu Ambalaj Tasarımı

Ambalajın kapak tasarımı Fusion 360-Autodesk programı kullanılarak yapılmıştır. Programde elde edilen tasarım Şekil 3'te gösterilmektedir. Tasarımın basılması için Ultimaker Cura programı kullanılmıştır. Dilimleme yazılımı (Slicing Software) olarak kullanılmıştır.



Şekil 3: 3 Boyutlu Ambalaj Tasarım Çalışmaları

3.5. Stabilité

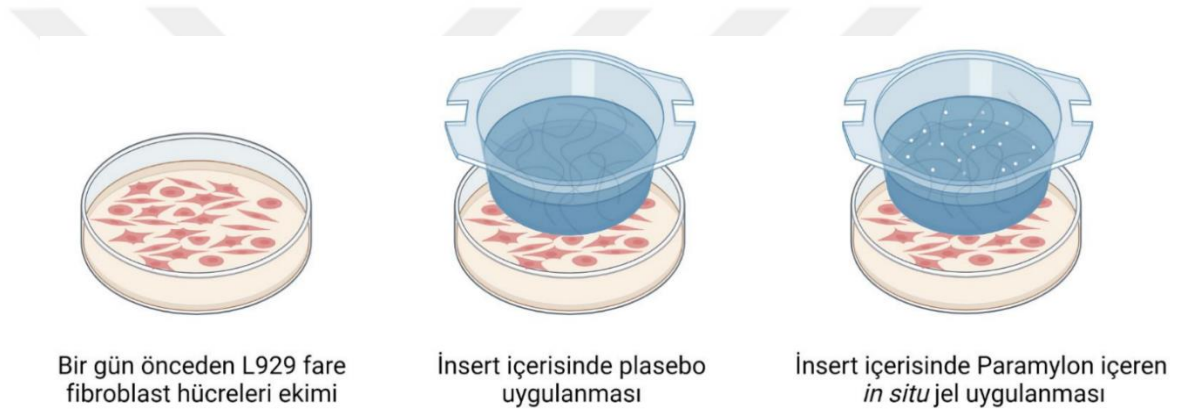
Stabilite çalışmaları için paramylon içeren formülasyonlarda pH, renk, koku, görünüş, viskozite ve jelasyon zamanı parametreleri incelenmiştir. Örnekler 4°C ve 25°C %60 relatif nemde stabilite kabinlerinde bekletilmiş ve ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

3.6. *In vitro* Etkinlik Çalışmaları

3.6.1. Biyouyumluluk Testi

Hücre canlılık testi L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde yapılmıştır. Hücreler DMEM-High Glucose, %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 L-glutamin, %0,1 Penisilin/streptomisin içeren besi ortamında T75 flaskta %5 CO₂'li nemli 37°C'deki inkübatörde kültüre alınmıştır. Hücreler çoğaldıktan sonra tripsin/EDTA ile kaldırılarak 4 °C'de 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak yeniden süspanse edilmiş ve hücre sayımı yapılarak 10⁵ hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. L929 hücreleri tutunduktan sonra *in situ* jel uygulanacak gözlere insert adı verilen porlu (0,4 µm) PET membrana sahip kalıplar yerleştirilmiş ve insert içine *in situ* jeller 200 µL olacak şekilde konularak %5 CO₂'li nemli 37°C'deki inkübatörde inkübe edilmiştir. *In situ* jeller uygulandıktan 24, 48 ve 72. Saat sonrasında Alamar hücre canlılık

testi uygulanmıştır. Alamar solüsyonu serumsuz DMEM-High Glucose ortamı içerisinde %10 olacak şekilde eklenmiştir. Hücrelerin üzerindeki besi ortamı çekilmiş ve yerine alamarlı besi ortamı koyulmuştur. Alüminyum folyo ile kapatılan kuyucuklu plaka inkübatöre kaldırılmıştır. 4 saat inkübasyonun ardından alamarlı besi ortamları 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılmış ve hücrelerin üzerine taze besi ortamı eklenmiştir. 96 kuyucuklu kültür kabı spektrofotometrede 570-600 nm’de okutulmuştur.



Şekil 4: Hücre kültürüne Paramylon içeren in situ jel uygulanması

3.6.2. Antioksidan Aktivite Tayini

Üç farklı konsantrasyon (0.1, 1, 10 mg/mL) olacak şekilde serum içermeyen besiyerinde (Dulbecco’s modified Eagle medium, DMEM) paramylon içeren örnekler hazırlanmıştır. Hücre canlılığındaki değişimin tespiti amacıyla çalışmada insan kortikal nöron hücre hattı (HCN-2, CRL-10742) kullanılmıştır. Hücreler %10 sıgır serum albümini (FBS, Hyclone) içeren Dulbecco’s modified Eagle besiyerinde (DMEM) (Life Technologies, Gibco BRL, Grand Island, NY) 37 °C ve %5 CO₂ %95 hava karışımında inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücreler %80-90 doluluk seviyesine gelince, her kuyucukta 5x10³ hücre bulunacak şekilde, %2 FBS içeren DMEM içinde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. 24 saat sonunda, üç farklı konsantrasyonda (0,1, 1, 10 mg/mL) hazırlanmış paramylon içeren örnekler ve

paramylon içermeyen örnek (placebo) hücrelere uygulanıp %5 CO₂/%95 hava karışımı inkübatörde 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Ardından H₂O₂ (250 µM) 2 saat süre ile her kuyucuğa uygulanmıştır. Uygulamalar sonunda hücre canlılığındaki değişimi gözlemlemek için MTS metodu kullanılmıştır. Önce 21 mL DPBS (Dulbecco’s phosphate buffered saline) ışıktan korunan bir falkon tüpün içine alınmıştır. Ardından 42 mg MTS[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum], inner salt; MTS: Promega, Madison, WI, ABD] reaktif tozu DPBS üstüne eklenmiştir. MTS çözünene kadar karıştırılmıştır. Çözeltinin 6.0-6.5 pH aralığında bulunduğu kontrol edilmiştir. MTS çözeltisi 0,2 µm’lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Fenazin metosülfat (PMS, Sigma) solüsyonu hazırlamak amacıyla 0.92 mg/mL konsantrasyon olacak şekilde DPBS içinde PMS reaktif tozu çözdürülmüştür. 2 mL MTS çözeltisi üstüne 100 µL PMS ilave edilerek çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Son hacmi 200 µL hücrelerin olduğu 96 kuyucuklu plakadaki her kuyucuğa 40 µL çalışma çözeltisi eklenmiştir. Plaka (37 °C ve %5 CO₂) 95% neme sahip inkübatörde yaklaşık 3.5 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında 490 nm’de spektrofotometrik (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo) ölçüm yapılmıştır. Deney gruplarında her bir grup en az üç tekrarla çalışılmıştır. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 5.03 for Windows Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA) bilgisayar yazılımıyla yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde çoklu mukayeselerde, çok değişkenli varyans analizleri (tek yönlü ANOVA) kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki etkileşimlere Post-Hoc Test olarak Tukey’s testi uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki fark p<0.05 olduğu zaman istatistiksel yönden anlamlı sayılmıştır. Sayısal değerlendirmelerde ortalama değerler ile standart sapmalar rapor edilmiştir.

3.6.3. Yara İyileştirme Testi

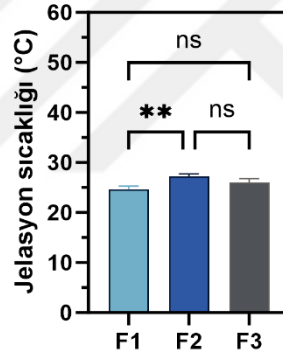
Çizik testi HaCaT insan keratinosit hücreleri ile yapılmıştır. Hücreler çoğaltıldıktan sonra 5x10⁵ hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Hücreler inkübatöre kaldırılmış ve hücrelerin kuyucuk yüzeyini tamamen kaplaması beklenmiştir. Hücreler kuyucuk yüzeyini kapladıktan sonra Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS ile bir kere yıkama yapılmıştır. Çizik 200 µL’lik mikropipet uçları ile uygulanmıştır. Ardından tekrar PBS ile yıkama yapılarak hücrelerin üzerine besi ortamı eklenmiştir. İnsert adı verilen porlu membran içeren malzemeler jel uygulanacak kuyucuklar üzerine yerleştirilmiş ve 200 µL jel insert içerisine eklenmiştir. Jel alt

katmandaki besi ortamı ile temas ettirilmiştir. Hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri 0, 24, 42 ve 48. saatlerde alınmıştır. Çizik mesafesi Image J programı ile ölçülmüştür. Görüntüler üzerinde yer alan ölçek çizgisi image J programına tanıtılmış ardından aradaki mesafe μm cinsinden ölçülmüştür. Her bir grup için 6 tekrar yapılmış, çekilen her fotoğraftan en az 6 ölçüm alınmıştır. Grafik ve istatistiksel analiz GraphPad Prism Programı ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Karakterizasyon çalışmaları

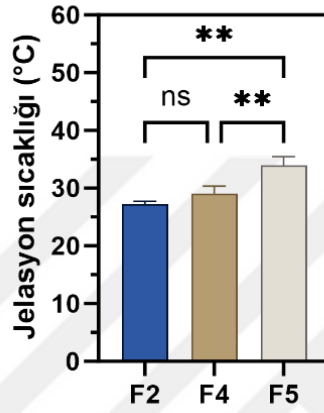
4.1.1 In situ Jel Formülasyonların Jelasyon Sıcaklığının Saptanması



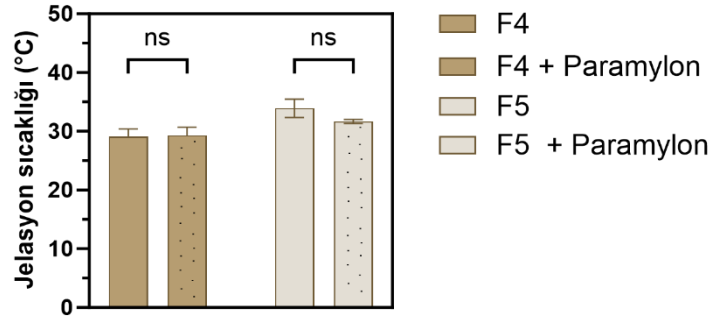
Grafik 1: Azalan Poloksamer 188 Konsantrasyonunun Jelleşme Sıcaklığı Üzerine Etkisi

Azalan Poloxamer 188 konsantrasyonlarında jelleşme sıcaklığında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Grafik 1). Azalan Poloxamer 407 konsantrasyonlarında jelleşme sıcaklığında artış görülmüştür (Grafik 2). Hazırlanan çeşitli formülasyonlarda 32 °C en yakın jelleşme sıcaklığı F4 ve F5 te elde edilmiştir. (F4: 29.1°C , F5: 33.9°C). F4 ve F5 yöntem bölümünde anlatıldığı de paramylonla hazırlanmıştır. Paramylon içeren ve içermeyen formülasyonların jelleşme sıcaklıkları arasında anlamlı bir farklılık

görülmemiştir (Grafik 3). 32°C'ye en yakın olan formülasyon F5'tir. Bu nedenle ileri aşamadaki çalışmalar F5 üzerinden ilerleyecektir.



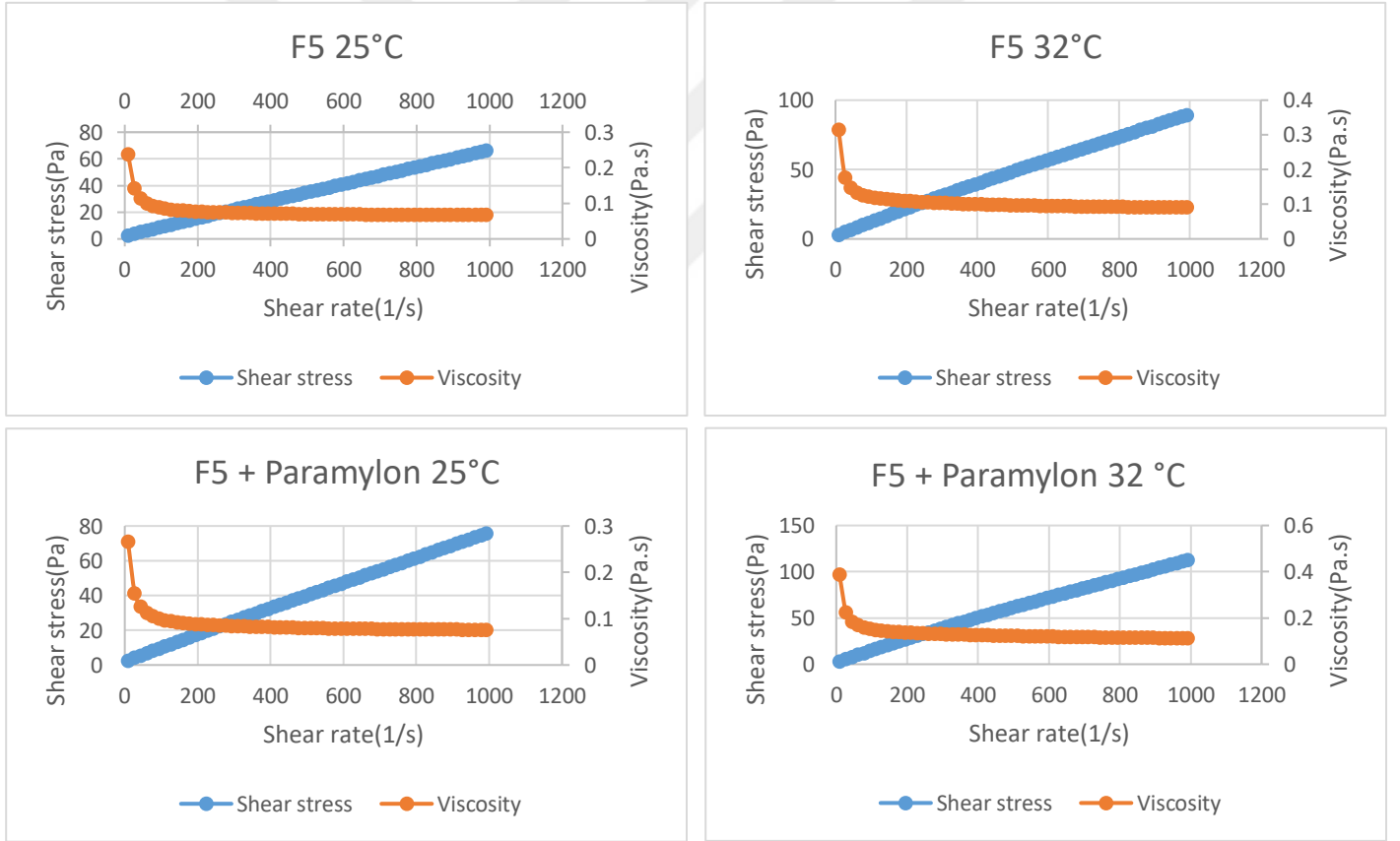
Grafik 2: Azalan Poloksamer 407 Konsantrasyonunun Jelleşme Sıcaklığı Üzerine Etkisi



Grafik 3: Poloksamer Örneklerine Paramylon Eklenmesinin Jelleşme Sıcaklığı Üzerine Etkisi

4.1.2 In situ Jel Formülasyonların Akış Özelliklerinin Tayini

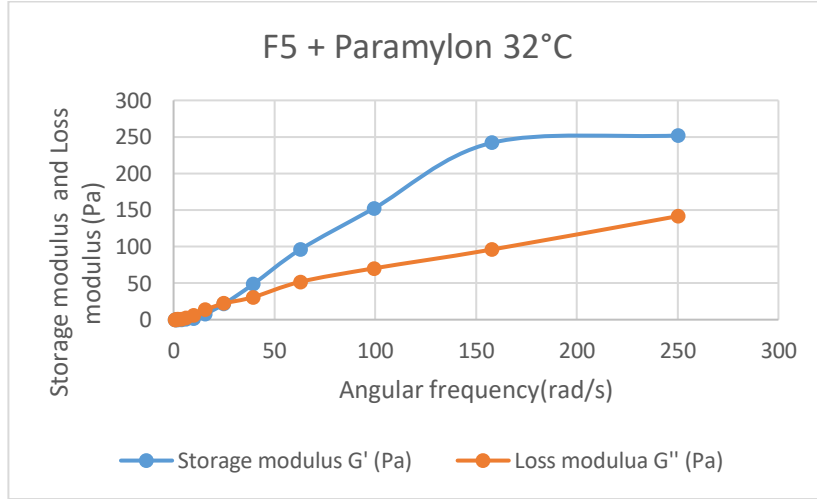
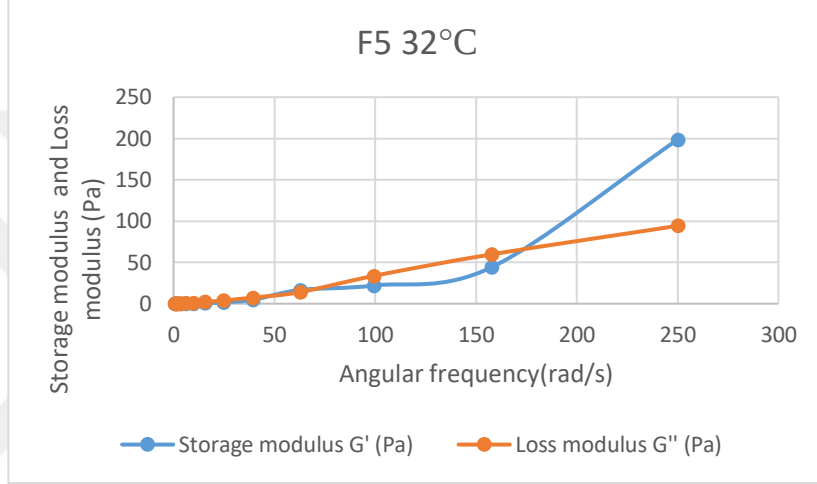
Paramylon içeren ve içermeyen F5 formülasyonlarının 25°C ve 32°C'deki viskozite grafikleri Grafik 4'te gösterilmektedir. Ortam sıcaklığı arttıkça viskozite yükselmiştir. 25 °C'de formülasyonların newtonian akış özelliği gösterdiği belirlenmiştir. 32°C'de ise viskozite eğrilerine bakıldığında, viskozitenin 25°C'ye göre arttığı görülmüştür. Paramylon ilavesiyle de formülasyonların grafiklerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Viskozitedeki artış literatürle uyumludur (Acartürk ve diğerleri, 2007).



Grafik 4: Paramylon İçeren ve İçermeyen F5 Formülasyonunun Viskozite Grafikleri

4.1.3 *In situ* Jel Formülasyonların Osilasyon Çalışmaları

Osilasyon çalışmaları formülasyonun akışkan halde olduğu 25°C’de ve jel formunda olduğu 32°C’de gerçekleştirilmiştir. Formülasyona paramylon ilavesiyle jel karakterinin arttığı görülmüştür (Grafik 5).



Grafik 5: Paramylon İçeren ve İçermeyen F5 Formülasyonunun Osilasyon Grafikleri

4.1.4 In situ Jel Formülasyonların Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi

Yöntem kısmında 3.2.2.4 numaralı başlıkta belirtildiği gibi yapılan TPA analizleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Formülasyon	Sıcaklık(°C)	Sertlik(g)±SS	Sıkıştırılabilirlik(g.s)±SS	Adeziflik(g.s)±SS	Koheziflik±SS	Elastikiyet±SS
F5-1	32	2.2548964	13.866	0.041279334	1.16950743	1.01017294
F5-2	32	2.2616951	13.706	0.040486154	1.03323874	1.00104822
F5-3	32	2.4022012	13.752	0.041290665	1.11677809	1.06016598
Ortalama	32	2.3062642	13.77484088	0.041018718	1.10650809	1.02379571
SS	32	0.0831534	0.082541308	0.000461248	0.0687124	0.03182628
F5+P-1	32	2.220903	13.899	0.040055571	1.050602	1.0061665
F5+P-2	32	2.1438512	13.225	0.038639179	1.04888388	0.98779247
F5+P-3	32	2.2798249	14.671	0.041290665	1.05716952	1.01037344
Ortalama	32	2.2148597	13.93155429	0.039995138	1.05221847	1.00144414
SS	32	0.068188	0.72353396	0.001326776	0.00437295	0.01200835

Tablo 3: Poloksamer ve Poloksamer-Paramylon karışımlarının TPA tablosu

4.1.5 pH

Paramylon içeren ve içermeyen formülasyonların pH'ları ortalama 7,1 bulunmuştur. Paramylon'un pH üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

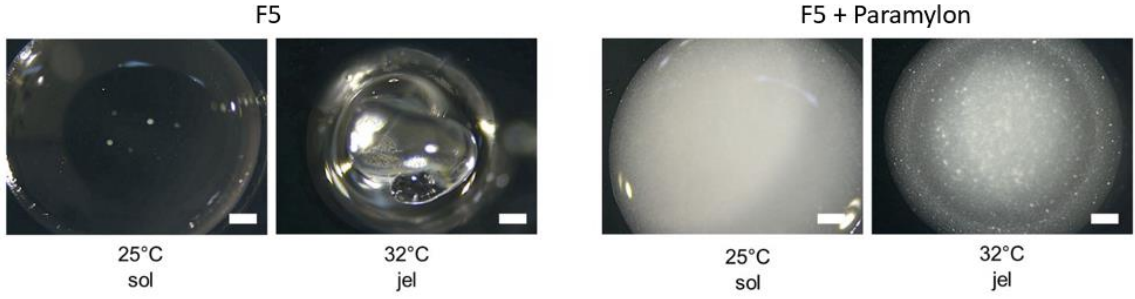
pH	F5	F5+Paramylon
1	7,16	7,11
2	7,10	7,10
3	7,11	7,08

Tablo 4: Poloksamer ve Poloksamer-Paramylon karışımlarının pH tablosu

4.1.6 Yapı Görüntüleme

4.1.6.1 Işık Mikroskobu

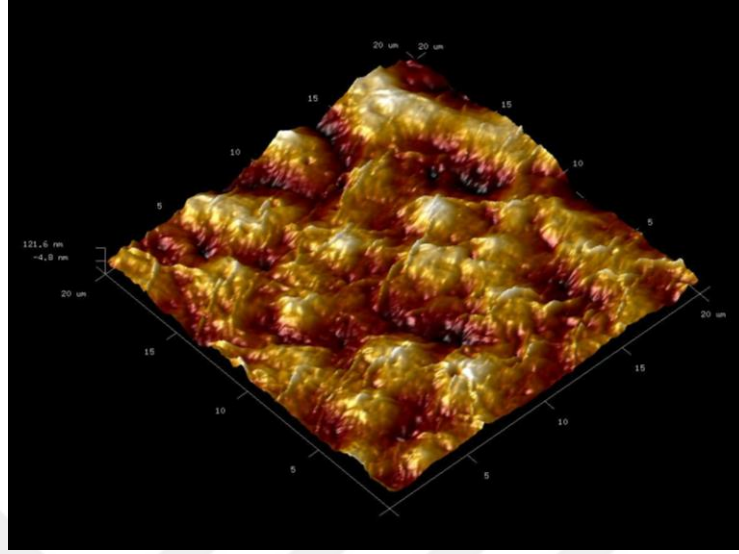
Şekil 5'te paramylon içeren ve içermeyen formülasyonların 25°C ve 32°C'deki ışık mikroskobu görüntüleri görülmektedir. Formülasyonların beklendiği gibi oda sıcaklığında sol, 32°C jel yapısında olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 5: Farklı sıcaklıklarda etken madde içeren ve içermeyen örnek görüntüleri

4.1.6.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu

Kurutulan örneğin AFM görüntüsü Şekil 6'da gösterilmektedir. Görüntüdeki yükseltieler Paramylon katı partiküllerini göstermektedir ve alanda homojen olarak dağıldıkları görsel olarak tespit edilmiştir.



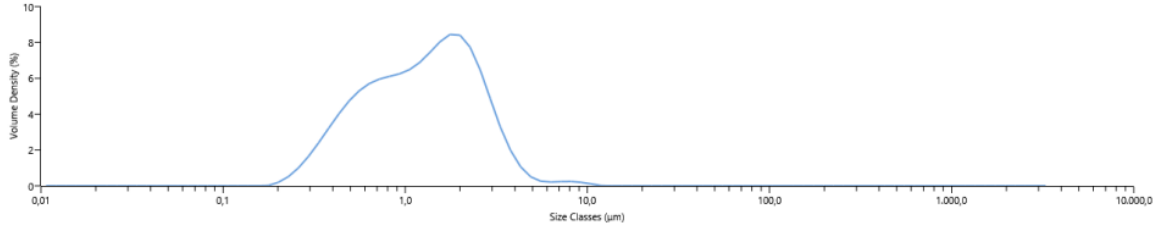
Şekil 6: Atomik Kuvvet Mikroskobu görüntüsü

4.1.7. Partikül Büyüklüğü

Paramylon içeren F5 formülasyonunun partikül büyüklüğü analiz sonuçları Tablo 5 ve Grafik 6'da gösterilmektedir.

Dx(10)	0.446 μm
Dx(50)	1.27 μm
Dx(90)	2.81 μm

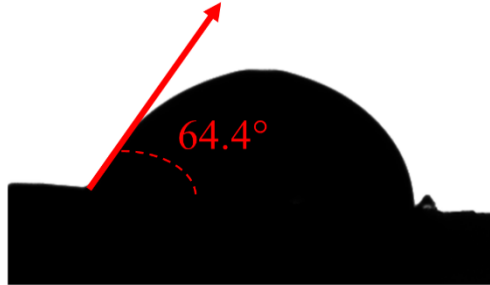
Tablo 5: Paramylon içeren F5 formülasyonunun partikül büyüklüğü analiz sonuçları



Grafik 6: Paramylon İçeren F5 Formülasyonunun Partikül Boyutu Dağılım Grafiği

4.1.8. Temas Açısı

Yapılan analiz sonucu temas açısı 64.4° bulunmuştur.

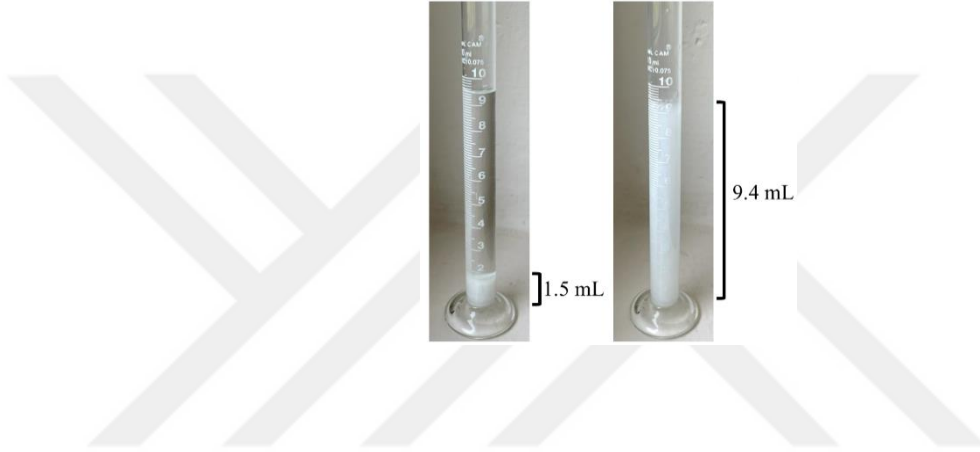


Şekil 7: Temas açısı görüntüsü

4.2. Paramylon'un Süspande Edilmesine Yönelik Testler

4.2.1 Çökme Hacmi

Yöntem kısmında 3.3.1 numaralı başlıkta belirtildiği üzere geliştirilen formülasyonun çökme hacmi hesaplamaları yapılmış ve 0.160 bulunmuştur.



Şekil 8: Çökme hacmi görüntüsü

4.2.2. Çökme Hızı

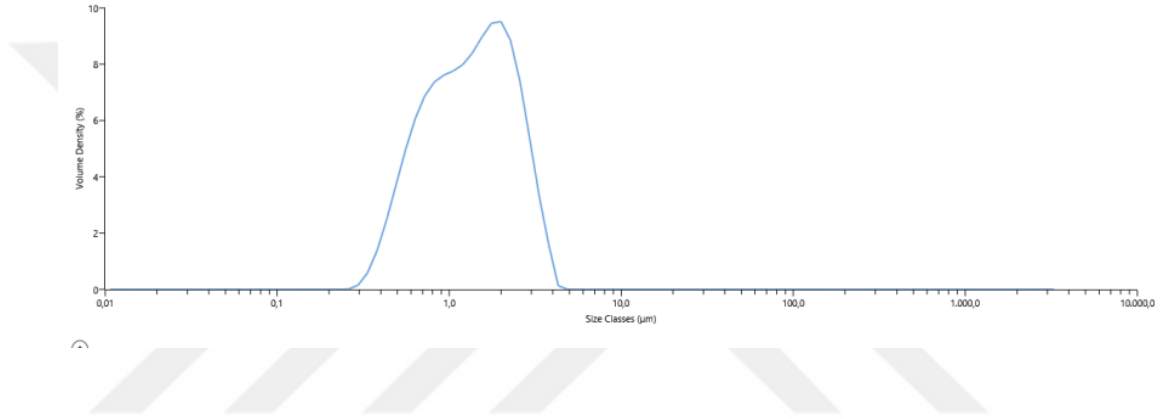
Formülasyonda 6 saat sonunda faz ayrışmasının başladığı, 24 saatte ise tamamen gerçekleştiği gözlenmiştir.

4.2.3. Tekrar Disperse Olabilme

Paramylon içeren F5 formülasyonunun tekrar disperse olabilme analiz sonuçları Tablo 6 ve Grafik 7’de gösterilmektedir.

Dx(10)	0.577 μm
Dx(50)	1.34 μm
Dx(90)	2.67 μm

Tablo 6: Paramylon içeren F5 formülasyonunun tekrar disperse olabilme analiz sonuçları



Grafik 7: Paramylon İçeren F5 Formülasyonunun Tekrar Disperse Olabilme Partikül Boyutu Dağılım Grafiği

4.3. 3 Boyutlu Ambalaj Tasarımı

Geliştirilen formülasyon tipine uygun olarak tasarlanan ambalaj Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9: Ambalaj tasarımı

4.4. Stabilité

Stabilite kabinlerinde bekletilen örneklerin ölçüm sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmektedir.

4.4.1 pH:

2 ay süreyle stabilite kabinlerinde bekletilen örneklerin pH'larında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo 7).

	Ortalama pH
4°C Başlangıç	7,10
4°C 1. AY	6,89
4°C 2. AY	6,92
25°C Başlangıç	6,78
25°C 1. AY	6,72
25°C 2. AY	6,70

Tablo 7: Stabilite kabinlerinde bekletilen örneklerin pH değerleri

4.4.2. Fiziksel Özellikler

2 ay süreyle stabilite kabinlerinde bekletilen örneklerin renk, koku ve görünüşlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.4.3. Viskozite:

2 ayın sonunda 25°C’de saklanan formülasyonun viskozitesinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Viskozitede yaşanan bu düşüş formülasyonun 25°C’de kararlı bir yapı göstermediğini ifade etmektedir. Bu nedenle formülasyonun 4°C’de saklanması gerekliliğine karar verilmiştir (Tablo 8).

	Ortalama Viskozite (Pa.s) (25°C)
4°C Başlangıç	0.266
4°C 1. AY	0.227
4°C 2. AY	0.292
25°C Başlangıç	0.276
25°C 1. AY	0.301
25°C 2. AY	0.154

Tablo 8: Stabilite kabinlerinde bekletilen örneklerin ortalama viskozite değerleri

4.4.4 Jelasyon sıcaklığı:

2 ay süreyle stabilite kabinlerinde bekletilen örneklerin jelasyon sıcaklıklarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo 9).

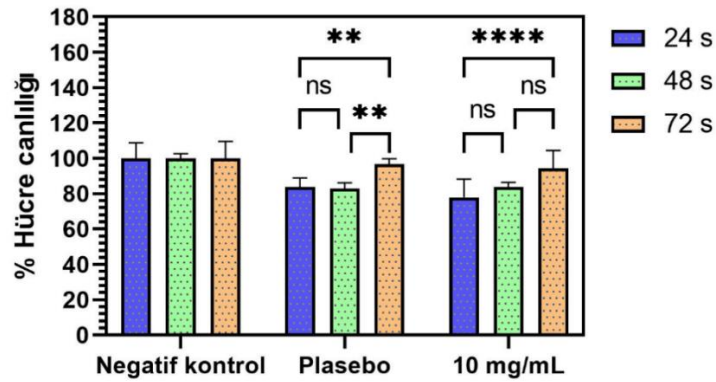
	Ortalama jelasyon sıcaklığı (°C)
4°C Başlangıç	32.6
4°C 1. AY	32.8
4°C 2. AY	32.1
25°C Başlangıç	32.0
25°C 1. AY	31.2
25°C 2. AY	31.4

Tablo 9: Stabilitate kabinlerinde bekletilen örneklerin ortalama jelasyon sıcaklığı değerleri

4.5. *In vitro* Etkinlik Çalışmaları

4.5.1 Biyouyumluluk Testi

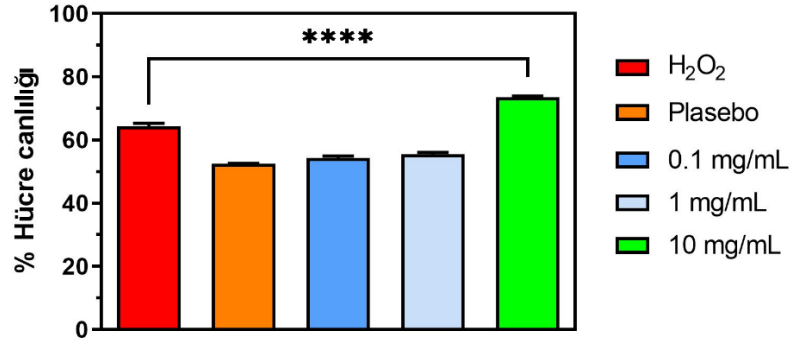
Biyoyumluluk testlerinde çıkan sonuçlar Grafik 8’de gösterilmiştir. Hücre canlılığı, 10 mg/mL paramylon içeren ve içermeyen (placebo) formülasyonlarda ISO 10993-5’e göre sitotoksik sınır kabul edilen %70’ten fazla çıkmıştır.



Grafik 8: 24-72 Saat Aralığında Farklı Grupların Hücre Canlılığında Meydana Gelen Değişimler

4.5.2. Antioksidan Aktivite Tayini

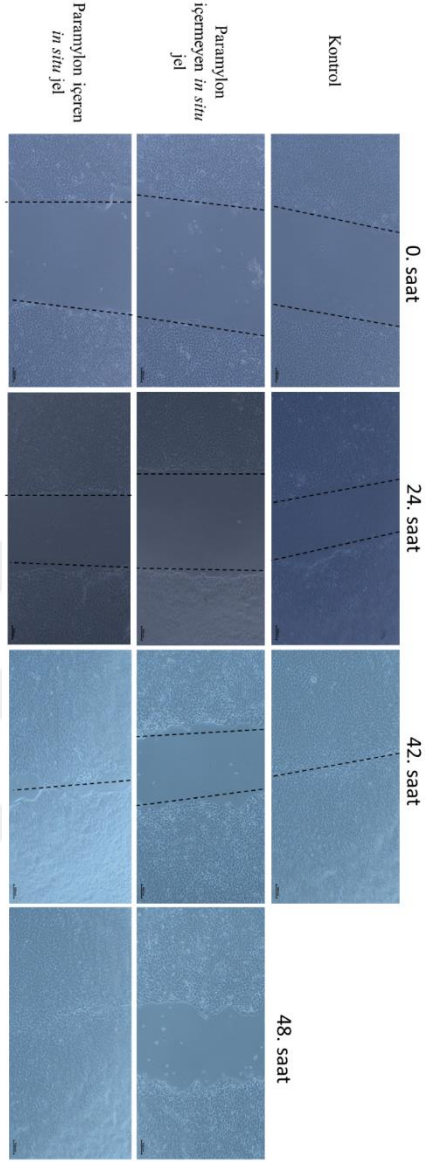
Hücreler üzerinde oksidatif stres oluşturduğu bilinen H_2O_2 uygulaması sonrası hücre canlılığı %64'e düşmüştür. H_2O_2 çeşitli konsantrasyonlarda paramylon içeren formülasyonlarla birlikte uygulandığında 10 mg/mL paramylon içeren formülasyonda hücre canlılığı %73 olarak tespit edilmiştir (Grafik 9).



Grafik 9: Çeşitli Dozlarda Paramylon İçeren Formülasyonların Antioksidan Aktivite Sonucu Hücre Canlılığına Etkisi

4.5.3. Yara İyileştirme Testi

Yapılan çizik testinde 42. saatte kapanmaya başlayan Paramylon içeren *in situ* jel uygulanmış grup tam kapanmayı 48. saatte göstermiştir. Paramylon içermeyen *in situ* jel içeren grupta ise kapanma olmamıştır (Şekil 10).



Şekil 10: Çizik testi sonuçları

5. TARTIŞMA

5.1 Karakterizasyon Çalışmaları

Öncelikle jelleşme sıcaklığı ve zamanı incelenmiştir. Jelasyon sıcaklığının bazı kriterleri karşılaması gereklidir. Çünkü jelleşme sıcaklığı yüksek olduğunda, formülasyon uygulandığı vücut bölgesinde jel haline gelemmez. Böylece kalıcılığı azalır. Bununla beraber aktığı için kayıp fazla olur. Düşük jelleşme sıcaklığı ise formülasyonun oda sıcaklığında jel haline gelmesine sebep olarak formülasyonu kısıtlayarak hazırlanma amacından uzaklaşmasına neden olur (Karavana, Rençber, Ay Şenyiğit ve Baloğlu, 2012). Hazırladığımız formülasyonun jelasyon sıcaklığı 32°C'dir. Böylece istenilen şekilde jelasyon sıcaklığı oda sıcaklığının üzerindedir ve formülasyonun kullanımını kolaylaştırmaktadır. Ek olarak jelasyon sıcaklığı çok yüksek olmadığı için deriye temas ettiğinde jelleşerek istenilen etkiyi sağlayacaktır. Sonuçlar literatürle uyumludur (Aksu, Yozgatlı, Okur, Ayla, Yoltaş ve Okur, 2019). Formülasyona, etken madde olan paramylon ilave edildiğinde jelleşme sıcaklığında herhangi bir değişiklik olmamıştır.

Genellikle Newtonian tipi akışkanlar düşük molekül ağırlıklı maddelerin bulunduğu sıvılardır. Örnek olarak, su, hafif ham petrol, organik ve inorganik sıvılar ve erimiş metaller örnek olarak verilebilir. Newtonian akış gösteren bir sıvıda, kayma gerilimini sabit sıcaklık ve basınçta kayma hızıyla doğru orantılıdır. Sabit orantı akışkanın dinamik viskozitesi olarak belirtilebilir (Islam ve Hossain, 2020). Hazırladığımız formülasyon 25 °C'de de bu özelliği göstermektedir. 25°C'de bu özelliği göstermesi saklama açısından avantajdır. Ancak bizim için önemli olan deriye temas ettiğinde gösterdiği davranıştır. 32°C'deki viskozite eğrilerine bakıldığında formülasyonun viskozitesi 25°C'ye göre artmıştır. Dolayısıyla formülasyon bu sıcaklıklarda amaçlandığı gibi jel haline gelmiştir.

Sıcaklığa duyarlı jellerle gerçekleştirilen akış çalışmalarında, yapılan rotasyonel hareket sebebiyle sistemde parçalanma meydana geldiği, bu şekilde de sistemin daha akışkan durum gösterdiği hakkında çalışmalar mevcuttur (Deasy ve Quigley, 1991). Bu yüzden çalışmalarda jelin parçalanmadığı, bütünlüğünü koruduğu düşük osilasyon açısının kullanıldığı osilasyon deneyleri yapılmıştır. Osilasyon analizleri esnasında formülasyona ilişkin elastik ve kayıp modül profilleri belirlenmektedir. Elastik modül, ürünün katıya benzer özelliklerini ifade eder. Stoklanan enerji değeridir. Elastik modül, formülasyonun

akıcı olduğunda azdır, sıcaklık artışı ve formülasyon jel haline gelerek yoğunluğunun artmasıyla bariz bir artma sergilemektedir (Jones, Woolfson ve Brown, 2000). Osilasyon çalışmaları bittiğinde iki farklı değer elde edilir. Bunlardan ilki elastisitenin ölçüsü olan depo modülü G' , ikincisi ise viskoz yapıyı gösteren G'' kayıp modülüdür. Yüksek konsantrasyondaki polimer çözeltilerinde polimer zincirleri arasında girişim meydana gelmektedir. Şayet bu karışık zincirlerin birbirlerinden ayrılması amacıyla gerekli zaman olursa, gerçekleştirilen osilasyon çalışmaları neticesinde viskoz modül, elastik modülden daha yüksek değerlere ulaşmaktadır ($G'' > G'$). Şayet zincirlerin açılması amacıyla gerekli süre tanınmazsa $G' > G''$ meydana gelir ve bu, polimerin katı benzeri bir karakter gösterdiğini ifade eder. Yapısal açıdan katı şekile benzedikçe uygulanan osilasyon sıklığına bağımlılık da azalır (Ikeda ve Nishinari, 2001). Grafik 4'te jel formülasyonunun 32°C'de osilasyon sıklığıyla bağlantılı şekilde meydana gelen değişimi gözlenmiştir. Bütün reolojik özelliklere bakıldığında, 32°C'de formülasyonunun jel karakter göstermiştir.

In situ jellerin mekanik özelliklerini belirlemek için, TPA analizinin gerçekleştirilmesi ve sonuçlarının gözden geçirilerek kullanılacak olan polimer tipinin ve oranının belirlenmesi literatürde oldukça fazla görülür (Jones, Lawlor ve Woolfson, 2003).

Çalışmada hazırlanan *in situ* jellerin sertlik, sıkıştırılabilirlik, adeziflik, koheziflik, ve elastikiyet gibi mekanik özellikleri TPA ile bakılmıştır. Çıkan sonuçlara Tablo 3'te yer verilmiştir.

Sertlik, formülasyonun uygulanabilirliği için dikkat edilmesi gereken unsurdur. Jelin deformasyonunu gerçekleştirmek için uygulanması gereken gücü anlatmaktadır. Sertlik; jellerin, istenilen bölgeye uygulanabilirliğini tanımlar. İstenilen jel sertlik değerinin, deriye kolaylıkla uygulamak için düşük çıkması hedeflenir (Jones, Woolfson ve Djokic, 1996). Literatür incelendiğinde sertliğin 2.52 ± 0.03 N ile 0.09 N arasında olduğunda jel formülasyonun deriye uygulanabileceği görülmektedir (Jones, Woolfson ve Djokic, 1996). Geliştirdiğimiz paramylon içeren ve içermeyen formülasyonlarımızın sertlik değerleri bu referans değerler arasında olup yara iyileşmesine destek olarak rahatlıkla deriye uygulanabilecektir.

Sıkıştırılabilirlik, belirli bir uzaklık süresince ürünün sıkıştırılabilmesi için istenen işi ifade etmektedir. Sıkıştırılabilirlik, jel formülasyonunun ambalajdan alınabilme ve uygulama bölgesinde kolay yayılabilme özelliğini gösterir. Jeli, ambalajından rahatça alabilmek ve uygulanan bölgeye basitçe yayılabilmesi için sıkıştırılabilirlik değerinin düşük olması istenir. Polimer karışımına paramylon ilavesiyle sıkıştırılabilirlik değerinin çok da değişmediği gözlemlenmiştir. Geliştirdiğimiz paramylon içeren *in situ* jellerin sıkıştırılabilirlik değerlerinin ortalaması 13.93 ± 0.72 'dir. Bu değer jelin deriye uygulanabilmesi için yeterince düşüktür. Bu da geliştirilen jelin bu açıdan yara iyileşmesine destek amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

Adezif özellik formülasyonun biyoadezifliği açısından göstergedir ve ürünün cihazın probundan ayrılması için gerekli olan işlemin hesaplanmasıyla tarif edilmektedir (Jones, Woolfson ve Djokic, 1996). Sonuçlar incelendiğinde; bütün formülasyonlar, adeziflik açısından birbirine anlamlı derecede yakın sonuçlar vermiştir. Kullanılan polimerin viskozitesi son formülasyonun adezifliğini önemli ölçüde etkiler. Düşük viskoziteli polimerler kullanıldığında adeziflik değeri düşük olmaktadır.

Kohezyon, jelin uygulanmasının ardından yapısal olarak tekrar eski durumuna gelmesinin ölçüsünü ifade etmektedir. Şayet jelin bileşimindeki polimerlerin kendi moleküllerini çekme gücü fazlaysa kohezifliği de fazladır. Bu durum, jelin uygulanacağı alanındaki gücünü yükselten unsurlardan biridir. Kohezifliğin yüksek olması, jelin uygulanmasının ardından tam bir yapısal geri dönüşümü gerçekleştirir. Kohezifliği fazla olan jel deriye uygulanmasının ardından jel halini uzun süre muhafaza eder (Baloğlu, Karavana, Ay Şenyigit ve Güneri, 2010). Paramylon içeren formülasyonun koheziflik değeri 1.05 ± 0.004 'tür. Bu değer literatürdeki benzer çalışmalarla kıyaslandığında koheziflik açısından formülasyonun başarılı olduğunu göstermektedir (Okur, Yozgatlı, Şenyigit, 2020).

Elastikiyet, bozunmuş sistemin ilk durumuna dönme gücünü ifade etmektedir. Bu değer düşük olması, elastikiyetin fazla olduğunu gösterir (Jones, Woolfson ve Djokic, 1996). Yüksek elastikiyet özellikleri olan formülasyon, uygulama alanındaki kalış zamanını yükselterek kontrollü ve uzun süreli bir salım gerçekleştirmektedir (Andrews, Gorman ve Jones, 2005). Polimer karışımına paramylon ilavesiyle elastikiyet değeri düşmüştür. Yani

elastikiyet artmıştır. Bu durum uygulama bölgesine yayılım açısından pozitif bir durumdur. Paramylon içeren formülasyonun elastikiyet değeri 1.001 ± 0.012 'tir. Literatürdeki benzer çalışmalar incelendiğinde *in situ* jellerin elastikiyet değerlerinin ortalaması yaklaşık 1 civarındadır (Okur, Yozgatlı, Şenyigit, 2020). Bu sonuçlardan hareketle geliştirdiğimiz formülasyonun elastikiyet değeri deride kullanıma uygundur.

Temas açısının 90° 'den düşük olması Paramylon'un Poloxamer karışımı ile ıslanabilir olduğunu göstermektedir. Formülasyonun temas açısı 64.4° olarak tespit edilmiştir. Çıkan değer Paramylon'un Poloxamer karışımı ile ıslanabilirliği açısından uygundur.

5.2. Paramylon'un Süspande Edilmesine Yönelik Çalışmalar

Formülasyonun çökme hacmi 0,160 bulunmuştur. Bu tip formülasyonlarda çökme hacminin 1'den küçük olması istenir (Higuchi, 1958). Bu değer 1'den büyük çıkarsa, çökme hacmi, süspansiyonun başlangıç hacminden daha büyüktür ve bu durum tedavide kullanımları kısıtlar. Bu sonuçlar ışığında geliştirdiğimiz formülasyonun çökme hacmi değeri literatürde istenen kritere oldukça uygundur ve hedeflediğimiz şekilde yara iyileşmesine destek olarak kullanımında sakınca yoktur.

Bütün süspansiyon sistemleri, bekletilince fazlarına ayrılır. Çökme hızının azaltılması ve çöken partiküllerin basitçe tekrar süspande olabilmesi amaçlanmalıdır. İdeal bir süspansiyonda partiküllerinin eşit dağılması ve çökmemesi veya çökme hızının çok yavaş olması hedeflenir. Çökme hızı, viskozite ile ters orantılıdır. Hazırladığımız formülasyonda 6 saat sonunda faz ayrışmasının başlayıp, 24 saatte ise tamamen faz ayrışması gözlemlenmesi hedeflenen süreler açısından uygundur.

5.3. 3 Boyutlu Ambalaj Tasarımı

Yarı katı preparatların ambalajlanmasında ürünün ambalajdan kolaylıkla çıkabilmesi önemli bir kriterdir. İlacın ambalajlanması sırasında ürünün optimum viskozite değerinde olması ve uygun akış özelliği göstermesi gerekir.

Plastikler, molekül kütlesi yüksek ve polimer yapıdadırlar. Düşük ağırlığa sahip oldukları için hem lojistik açıdan ve hem de hastaların taşınması açısından oldukça avantajlıdırlar. Kolayca şekil verilebilmeleri, yüksek kalitede hazırlanabilmeleri ve kırılmaya karşı dayanıklı olmaları ambalaj malzemesi olarak kullanımlarını cazip kılar.

3B baskı teknolojisi ilave üretim olarak isimlendirilir ve materyalleri katman katman ilave ederek, farklı pek çok şekil ve boyutta nesneler meydana getirir (Shahrubudin, Lee ve Ramlan, 2019). Nesnelerin bilgisayar destekli tasarım yazılımı aracılığıyla meydana getirildiği bu teknolojinin, zaman içinde farklı endüstri kollarında kullanımı yaygınlaşmıştır (Trenfield, Awad, Goyanes, Gaisford ve Basit, 2018).

3B yazıcıların kullanımının bu kadar fazla olması ve süratle yayılmasının belki de en önemli nedeni klasik metotlara göre pratik olması ve bu yöntemlerle meydana getirilemeyecek şekle sahip materyallerin üretimine kısa sürede ve basit bir şekilde imkan vermesidir. Bu şekilde üretim maliyetleri de düşürmektedir.

Bu bilgiler ışığında geliştirdiğimiz formülasyonun saklanması için en uygun şekle sahip ambalaj formunu 3B yazıcı kullanarak plastik materyalle tasarladık.

Sonuç olarak geliştirilen ambalaj ile lojistik, maliyet, üretim kolaylığı ve hasta kullanımı açısından en uygun ambalajı geliştirmiş olduk.

5.4. Stabilité

Stabilite deneyleri buzdolabında 4°C'de ve stabilite kabininde 25 ± 1 °C %60 nemde 2 ay süre ile gerçekleştirildi. Formülasyonlar her ay periyodik olarak analiz edildi ve 2 ay boyunca 4°C'de pH, görünüş, viskozite, jelleşme sıcaklığı değerlerinde kayda değer bir değişiklik olmadığı tespit edildi. Bu durum, formülasyonun 4°C'de stabil olduğunu ortaya koymuştur.

Paramylon ilavesi yapılan *in situ* jellerin pH değerleri Tablo 4'te gösterilmiştir. Literatürde yara iyileştirme amacıyla geliştirilen *in situ* jeller için 5.32-7.669 pH aralığının uygun olduğu bildirilmiştir (Okur, Ayla, Batur, Yoldaş, Genç ve diğerleri, 2019). Bu sebeple formülasyonun pH'ı yaraya uygulamak için uygun bulunmuştur (Aksu, Yozgatlı, Okur, Ayla, Yoltaş ve Okur 2019).

5.5. *In vitro* Etkinlik Çalışmaları

Paramylon içeren formülasyonun L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde toksik olmadığını, hücre çoğalmasını desteklediğini ve formülasyona Paramylon ilavesiyle de hücre canlılığının istenen düzeyde olduğu görülmüştür. Biyouyumluluk testlerinde çıkan sonuçlarda hücre canlılığı, paramylon içeren formülasyonda sitotoksik sınır kabul edilen %70'ten fazla çıkmıştır. Bu da, Paramylon içeren formülasyonların yara tedavisinde kullanım için optimal biyouyumluluğa sahip olduğunu göstermektedir.

Kontrolsüz inflamasyon, yara onarımını engelleyen önemli bir faktördür. Kontrolsüz inflamasyonun azaltılması, yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırabilir. ROS'un yüksek seviyeleri, yara enfeksiyonuna önemli ölçüde katkıda bulunur. Çünkü ROS, lipit peroksidasyonu yoluyla yara iyileşmesini engeller. Bu nedenle antioksidan materyallerin geliştirilmesi yara onarımı alanında güncel bir konudur. Bugüne kadar bitkilerden ekstrakte edilen polisakkaritlerin, mantar polisakkaritlerinin ve alg polisakkaritlerinin etkili ROS azaltıcı oldukları gösterilmiştir. Yara onarımı alanında Paramylon'un ciltle doğrudan teması halinde antioksidan etki gösterip göstermediği araştırılmamıştır. Bu nedenle paramylon içeren ve içermeyen formülasyonların serbest radikalleri temizleme ve ROS'u azaltma gibi antioksidan etkilerini araştırdık. Çıkan sonuçlar ışığında Paramylon'un bu dozda H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif stresi anlamlı bir şekilde engellediğini ve dolayısıyla istenen düzeyde antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. H₂O₂, farklı konsantrasyonlarda paramylon içeren formülasyonlarla birlikte uygulandığında 10 mg/mL paramylon içeren formülasyonda hücre canlılığı %73 olarak tespit edilmiştir.

Çizik testi sonuçlarına göre Paramylon içeren *in situ* jel, kontrol grubuyla kıyaslandığında kapanma net bir şekilde görülmüştür. Yapılan çizik testinde yara, Paramylon içeren *in situ* jelle 42. saatte kapanmaya başlamıştır. Tam kapanma ise 48. saatte gözlemlenmiştir.

Bu durum da formülasyonun, antioksidan etkisinin yanı sıra yara iyi edici olarak da kullanılabileceğini göstermiştir. Antioksidan özelliklere sahip olan ve yara iyileşmesini destekleyen Paramylon'un, yara onarımını alanında popüler hale gelmesi beklenmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, paramylon yüklü *in situ* jellerin topikal kullanım için potansiyeli değerlendirildi. Bu formülasyonlar deneysel olarak incelendi ve başarıyla optimize edildi. Paramylon içeren *in situ* jellerin, soğuk yöntemle başarıyla hazırlanabileceği görüldü. Tüm formülasyonların görünüş, pH ve jelleşme süresi istenilen düzeyde gözlemlendi. Ayrıca jelin 4°C'de 2 ay stabil kaldığı görüldü. Bu sonuçlar formülasyonun yara iyileşmesinde kullanılabileceğini gösterdi. Sonuç olarak, bu çalışma paramylon yüklü *in situ* jellerin yara iyileştirici olarak topikal uygulanması için yeni bir pencere açabilir, yara iyileşmesinde geleneksel dermal kremlere göre uygulanma kolaylığı ve uygulandığı bölgede jelleşerek daha kalıcı olması sebebiyle iyi bir alternatif olabilir.

Çalışmada yapılan paramylon içeren formülasyonların; deride görülen yaraların iyileşmesinde aktif olarak yararlanılabilen, hastaların tedaviye uyumunu ve hayat kalitesini yükselten, ilaç endüstrisinde tercih edilen konvansiyonel ürünlerin yerine kullanılabilecek formülasyonlar olması amaçlanmıştır. Yara tedavisinde topikal uygulanan paramylon ilave edilmiş *in situ* jel ilk kez bu çalışmada yapılmıştır. Ayrıca, Türkiye İlaç Piyasasında paramylonun yara iyileştirmesinde topikal olarak kullanılan ürünü olmamasından ötürü, çalışmamın literatüre ve ilaç endüstrisine faydalı olacağı öngörülmektedir. Bu çalışmada yara iyileşmesi için topikal olarak kullanılan paramylon içeren *in situ* jel formülasyonları başarılı bir şekilde yapılmıştır. Bütün formülasyon çalışmalarının kendisine has karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve optimum formülasyonlar belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarıyla belirlenen formülasyonların biyoyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen *in vitro* yara iyileştirici etkililik denemeleri neticesinde, formülasyonun yara iyileştirici özellik gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçta, yukarıda ifade edilen formülasyonun, *in vitro* karakterizasyon ve yara iyileştirme etkisi denemeleri dikkate alındığında; yara iyileşmesi için ilaç piyasasında kullanılan geleneksel preparatlara alternatif olabileceği öngörülmektedir. Özellikle *in vitro* yara iyileştirme etkisi çalışması gerçekleştirilen ve hasta tarafından kullanılması basit olan formülasyonunun kullanılması ile hasta uyuncunun yükseleceği düşünülmektedir. Ayrıca etkili bir şekilde yara iyileşmesini hızlandıracağını öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Degim, T., Degim, Z., Doganay, T. ...Tırnaksız, F. (2007). Modern Farmasötik Teknoloji: Deriden Emilim ve Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar. Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Ankara, 337-361. Erişim Adresi: https://e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/tebakademi/modern_farmasotk/20.pdf

Aksu, N. B., Yozgatlı, V., Okur, M. E., Ayla, Ş., Yoltaş, A., Okur, N. Ü. (2019). Preparation and evaluation of QbD based fusidic acid loaded *in situ* gel formulations for burn wound treatment. *Journal of drug delivery science and technology*, 52, 110-121. doi: 10.1016/j.jddst.2019.04.015

Andrews, G. P., Gorman, S. P., Jones, D. S. (2005). Rheological characterisation of primary and binary interactive bioadhesive gels composed of cellulose derivatives designed as ophthalmic viscosurgical devices. *Biomaterials*, 26(5), 571-580. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.02.062

Arslan Azizoğlu, G. (2014). UV Kaynaklı Deri Hasarı için Kolloidal Taşıyıcı Sistemlerin Tasarlanması (Yüksek Lisans Tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>

Attinger, C. E., Janis, J. E., Steinberg, J., Schwartz, J., Al-Attar, A., Couch, K. (2006). Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7S), 72S-109S. doi: 10.1097/01.prs.0000225470.42514.8f

Ayla, S., Okur, M. E., Günal, M. Y., Özdemir, E. M., Çiçek Polat, D., Yoltaş, A., ... Karahüseyinoğlu, S. (2019). Wound healing effects of methanol extract of *Laurocerasus officinalis* roem. *Biotechnic & Histochemistry*, 94(3), 180-188. doi: 10.1080/10520295.2018.1539242

Baloglu, E., Karavana, S. Y., Senyigit, Z. A., Guneri, T. (2011). Rheological and mechanical properties of poloxamer mixtures as a mucoadhesive gel base. *Pharmaceutical development and technology*, 16(6), 627-636. doi: 10.3109/10837450.2010.508074

- Barry, B. W. (1991). Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release*, 15(3), 237-248. doi: 10.1016/0168-3659(91)90115-T
- Bonacucina, G., Cespi, M., Misici-Falzi, M., Palmieri, G. F. (2006). Rheological, adhesive and release characterisation of semisolid Carbopol/tetraglycol systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(2), 129-140. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.09.034
- Bonamonte, D., Belloni Fortina, A., Neri, L., Patrizi, A. (2014). Fusidic acid in skin infections and infected atopic eczema. *G Ital Dermatol Venereol*, 149(4), 453-459. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25068235>.
- Chamcheu, J. C., Siddiqui, I. A., Syed, D. N., Adhami, V. M., Liovic, M., Mukhtar, H. (2011). Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508(2), 123-137. doi: 10.1016/j.abb.2010.12.019
- Deasy, P. B., Quigley, K. J. (1991). Rheological evaluation of deacetylated gellan gum (Gelrite) for pharmaceutical use. *International journal of pharmaceutics*, 73(2), 117-123. doi: 10.1016/0378-5173(91)90034-L
- Diegelmann, R. F., Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front biosci*, 9(1), 283-289. doi: 10.2741/1184
- Dumortier, G., El Kateb, N., Sahli, M., Kedjar, S., Boulliat, A., Chaumeil, J. C. (2006). Development of a thermogelling ophthalmic formulation of cysteine. *Drug development and industrial pharmacy*, 32(1), 63-72. doi: 10.1080/03639040500390934
- Giannatsis, J., Dedoussis, V. (2009). Additive fabrication technologies applied to medicine and health care: a review. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 40, 116-127. doi: 10.1007/s00170-007-1308-1
- Gürsoy, A.Z. (2002). Kontrollü Salım Sistemleri: Transdermal Sistemler. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, İstanbul, 239-260. Erişim adresi: <http://www.kssd.org.tr/publications.php>

- Higuchi, T. (1958). Some physical chemical aspects of suspension formulation. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 47(9), 657-660. doi: 10.1002/jps.3030470913
- Hsu, S., Thakar, R., Li, S. (2007). Haptotaxis of endothelial cell migration under flow. *Vascular Biology Protocols*, 237-250. doi: 10.1007/978-1-59745-571-8_15
- Ikedu, S., Nishinari, K. (2001). “Weak gel”-type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated κ -carrageenan helices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4436-4441. doi: 10.1021/jf0103065
- Islam, M. R., Hossain, M. E. (2020). *Drilling engineering: towards achieving total sustainability*. Gulf Professional Publishing. doi: 10.1016/B978-0-12-820193-0.00002-2
- Jeong, B., Choi, Y. K., Bae, Y. H., Zentner, G., Kim, S. W. (1999). New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 62(1-2), 109-114. doi: 10.1016/S0168-3659(99)00061-9
- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., de la Llera Moya, M., Phillips, M. C., ... Tall, A. R. (1997). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 20982-20985. doi: 10.1074/jbc.272.34.20982
- Jones, D. S., Lawlor, M. S., Woolfson, A. D. (2003). Rheological and mucoadhesive characterization of polymeric systems composed of poly (methylvinylether-co-maleic anhydride) and poly (vinylpyrrolidone), designed as platforms for topical drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(5), 995-1007. doi: 10.1002/jps.10357
- Jones, D. S., Woolfson, A. D., Brown, A. F., Coulter, W. A., McClelland, C., Irwin, C. R. (2000). Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release*, 67(2-3), 357-368. doi: 10.1016/S0168-3659(00)00231-5

- Jones, D. S., Woolfson, A. D., Djokic, J. (1996). Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. *Journal of Applied Polymer Science*, 61(12), 2229-2234. doi: 10.1002/(SICI)1097-4628(19960919)61:12<2229::AID-APP24>3.0.CO;2-0
- Juhász, J., Lenaerts, V., Raymond, P., Ong, H. (1989). Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible poloxamer gels. *Biomaterials*, 10(4), 265-268. doi: 10.1016/0142-9612(89)90103-8
- Karavana, S. Y., Rençbe, S., Şenyiğit, Z. A., Baloğlu, E. (2012). A new *in situ* gel formulation of itraconazole for vaginal administration. *Pharmacology & Pharmacy*, 3(04), 417-426. doi: 10.4236/pp.2012.34056
- Kinch, M. S., Patridge, E., Plummer, M., Hoyer, D. (2014). An analysis of FDA-approved drugs for infectious disease: antibacterial agents. *Drug discovery today*, 19(9), 1283-1287. doi: 10.1016/j.drudis.2014.07.005
- Kiss, J. Z., Roberts, E. M., Brown, R. M., Triemer, R. E. (1988). X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from Euglena. *Protoplasma*, 146, 150-156. doi: 10.1007/BF01405924
- Koizumi, N., Sakagami, H., Utsumi, A., Fujinaga, S., Takeda, M., Asano, K., ... Yamamoto, N. (1993). Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. *Antiviral research*, 21(1), 1-14. doi: 10.1016/0166-3542(93)90063-O
- Lampe, M. A., Williams, M. L., Elias, P. M. (1983). Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *Journal of Lipid Research*, 24(2), 131-140. doi: 10.1016/S0022-2275(20)38006-8
- Madan, M., Bajaj, A., Lewis, S., Udupa, N., Baig, J. A. (2009). *In situ* forming polymeric drug delivery systems. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 71(3), 242. doi: 10.4103/0250-474X.56015
- Menon, G. K. (2002). New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced drug delivery reviews*, 54, S3-S17. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00121-7

Norbury, W., Herndon, D. N., Tanksley, J., Jeschke, M. G., Finnerty, C. C., Scientific Study Committee of the Surgical Infection Society. (2016). Infection in burns. *Surgical infections*, 17(2), 250-255. doi: 10.1089/sur.2013.134

Okur, M. E., Ayla, Ş., Batur, Ş., Yoltaş, A., Genç, E., Pertek, S., Üstündağ Okur, N. (2019). Evaluation of in situ gel containing pycnogenol for cutaneous wound healing. *Medeniyet medical journal*. doi: 10.5222/MMJ.2019.29053

Okur, N. Ü., YOZGATLI, V., Şenyiğit, Z. (2020). Formulation and detailed characterization of voriconazole loaded in situ gels for ocular application. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), 33-49. doi: doi.org/10.33483/jfpau.586590

Parsak, C. K., Sakman, G., Çelik, Ü. (2007). Yara iyileşmesi, yara bakımı ve komplikasyonları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 16(2), 145-159. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/25425>

Rayna, T., Striukova, L. (2016). From rapid prototyping to home fabrication: How 3D printing is changing business model innovation. *Technological Forecasting and Social Change*, 102, 214-224. doi: 10.1016/j.techfore.2015.07.023

Ruel-Gariepy, E., Leroux, J. C. (2004). In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2), 409-426. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.03.019

Schöfer, H., Simonsen, L. (2010). Fusidic acid in dermatology: an updated review. *European Journal of Dermatology*, 20(1), 6-15. doi: 10.1684/ejd.2010.0833

Shahrubudin, N., Lee, T. C., Ramlan, R. (2019). An Overview on 3D Printing Technology: Technological, Materials, and Applications. *Procedia Manufacturing*, 35, 1286–1296. doi: 10.1016/J.PROMFG.2019.06.089

Sivrikaya, S. K., Erdem, G. (2019). Kronik Hastalıklarda Yara Bakımı. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8(2), 99-104. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/balikesirsbd/issue/44010/507883>

- Srividya, B., Cardoza, R.M., Amin, P.D. (2001). Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered *in situ* gelling system. *Journal of Controlled Release*, 73, 205–211. doi: 10.1016/S0168-3659(01)00279-6
- Trenfield, S. J., Awad, A., Goyanes, A., Gaisford, S., & Basit, A. W. (2018). 3D Printing Pharmaceuticals: Drug Development to Frontline Care. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(5), 440–451. doi: 10.1016/j.tips.2018.02.006
- Udy, A. A., Roberts, J. A., Lipman, J., Blot, S. (2018). The effects of major burn related pathophysiological changes on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drug use: An appraisal utilizing antibiotics. *Advanced drug delivery reviews*, 123, 65-74. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.019
- Wang, Y., Beekman, J., Hew, J., Jackson, S., Issler-Fisher, A. C., Parungao, R., ... Maitz, P. K. (2018). Burn injury: challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Advanced drug delivery reviews*, 123, 3-17. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.018
- Yasuda, K., Ogushi, M., Nakashima, A., Nakano, Y., Suzuki, K. (2018). Accelerated wound healing on the skin using a film dressing with β -glucan paramylon. *in vivo*, 32(4), 799-805 doi: 10.21873/invivo.11310

Teşekkür

Tezimin tüm aşamalarında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bana her zaman anlayışla yaklaşan, değer veren çok kıymetli danışman hocam Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özgen ÖZER'e,

Tez çalışmalarına değerli katkılarından dolayı Anabilim Dalımızın Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Işık ÖZGÜNEY, Prof.Dr. Evren Homan GÖKÇE, Prof.Dr. Sinem Yaprak KARAVANA, Doç.Dr. Sakine TUNCAY TANRIVERDİ olmak üzere, akademik olarak gelişime katkı sağlayan, her zaman bir aile sıcaklığı hissettiğim tüm Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üye ve Yardımcılarına,

Tezimin tüm aşamalarında bilgi ve önerilerini paylaşan, ilgi ve yardımlarıyla bana her zaman destek olan, Arş. Gör. Gülşen AYBAR TURAL'a,

Tezin 3 boyutlu yazıcı yardımıyla ambalaj tasarımı ve düzenlenmesinde vermiş olduğu destek ve yardımlarından dolayı Öğretim Görevlisi Dr. Ecz. Mehmet Ali EGE'ye,

Tezin her aşamasında yardım ve desteğini sunarak bu tezin gerçekleşmesinde büyük emeği olan kıymetli arkadaşım, Arş. Gör. Oğuzhan KAYA'ya

Çalışmalarımın farklı aşamalarında yardımına koşan arkadaşlarım Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı doktora öğrencileri Ecz. Zeren ARDA, Arş. Gör. Meliha GÜNEŞ, Ecz. Bengi FİLİZ, Ecz. Beyza AKANOĞLU'na

Tez çalışmalarına desteklerinden ötürü Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi'ndeki araştırmacılara,

Bana her zaman anlayışlı tavırlarıyla yaklaşan, süreç boyunca bana yardımcı olan Farmasötik Teknoloji Anabilim dalı sekreterimiz Aynur ERBATUR'a,

Bütün hayatım boyunca sevgi ve anlayışı ile hep yanımda olan ağabeyim Gökem TÜRK'e

Her zaman yanımda olan, bana güç veren, yardımı ve anlayışı için babam Ecz. Rasim TÜRK'e

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımın her aşamasında olduğu gibi tezim sırasında da özveriyle bana her yönden destek olan, fedakârlık ve sevgisini hiçbir zaman eksik etmeyen annem Ecz. Aysun TÜRÖ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, Aralık 2023

Ecz. Kıvanç TÜRÖ

