

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HIV ENFEKSİYONLARINDA GÖRÜLEN ORAL  
LEZYONLARIN TEDAVİSİ İÇİN GİRİŞİMSEL  
OLMAYAN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN  
GELİŞTİRİLMESİ**

**Ecz. Z. Gülşen ÖNER**

**Farmasötik Teknoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2011**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HIV ENFEKSİYONLARINDA GÖRÜLEN ORAL  
LEZYONLARIN TEDAVİSİ İÇİN GİRİŞİMSEL  
OLMAYAN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN  
GELİŞTİRİLMESİ**

**Ecz. Z. Gülşen ÖNER**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Sevda ŞENEL**

**Farmasötik Teknoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2011**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Teknoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Nursen Ünlü  
(Hacettepe Üniversitesi)



Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Sevda Şenel  
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof. Dr. Selma Şahin  
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Doç. Dr. Figen Tırnaksız  
(Gazi Üniversitesi)



Üye:

Doç. Dr. R. Neslihan Gürsoy  
(Hacettepe Üniversitesi)



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bilimsel bilgilerini benimle paylaşan ve her zaman her türlü konuda desteğini gördüğüm tez danışmanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sevda ŞENEL'e,

Mikrobiyolojik çalışmaların yürütülmesinde bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Öğr. Gör. Gülçin Akca'ya,

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'mızdaki değerli hocalarıma,

Çalışmam sırasında arkadaşlıklarıyla büyük yardım ve desteklerini gördüğüm başta Kim. S. Burçin Hizmetli, Ecz. Özge Çevik, Ecz. Merve Cansız, Ecz. Esra Bayraktar (B.U), Ecz. Merve Günbeyaz (B.U) ve Ecz. Can Sarısözen (B.U) olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın bütün yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, sekreterlerine, teknisyen ve hizmetlilerine,

Tez çalışmamın her aşamasında her zaman desteklerini hissettiğim sevgili aileme, her zaman yanımda olan Engin Doğan'a ve arkadaşlarıma tüm kalbimle teşekkür ederim.

## ÖZET

**Öner, Z. G. HIV Enfeksiyonlarında Görülen Oral Lezyonların Tedavisi İçin Girişimsel Olmayan İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2011.** Oral mukozal lezyonlar (OML) HIV enfeksiyonunun ilk ve en önemli göstergelerindendir. HIV enfeksiyonunda sık görülen oral lezyonlar kandidiyazis, tüylü lökoplaki, kaposi sarkomu, linear gingival eritem, nekrotizan ülseratif gingivit, nekrotizan ülseratif periodontit ve non-Hodgkin lenfomadır. Oral lezyonların varlığı hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Genellikle oral lezyonların tedavisinde kullanılan topikal ilaçlarla uygulama bölgesinde istenen etkinlikte tedavi sağlanamamaktadır. Bunun başlıca nedeni dozaj şeklinin dolayısıyla ilacın uygulama sırasında tükürük salgısı, dil ve ağız hareketi, yutma nedeniyle ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Bu sorunları ortadan kaldırarak ilacın etkinliğini arttırabilmek için biyoadeziv formülasyonlar kullanılmaktadır. Non-toksik, non-alerjenik olmasının yanı sıra, biyoyumlu, biyoparçalanabilir ve biyoadeziv olması nedeniyle kitosanın oral mukozal ilaç uygulamasında yaygın kullanımı bulunmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal, hemostatik, yara iyileştirici, doku rejenerasyonu sağlayıcı gibi çok sayıda biyolojik aktivite de göstermektedir. Bu çalışmada, HIV enfeksiyonlarında görülen oral lezyonların tedavisinde kullanılan güçlü antiinflamatuvar etkili bir glukokortikoid olan triamsinolon asetonitin (TAC) uygulanması amacıyla, farklı tip ve özelliklere (elde edildiği kaynak, molekül ağırlığı ve çözünürlük) sahip kitosanlar kullanılarak jel formülasyonları hazırlanmıştır. TAC % 0.1 a/h konsantrasyonda formülasyonlara ilave edilmiştir. Geliştirilen jel formülasyonların viskoziteleri, in vitro salım özellikleri ve mukoadezyon özellikleri incelenmiştir. Ayrıca bu formülasyonların tek başlarına periodontal/mukozal lezyonlara sebep olabilen bakterilerden olan *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*); bir maya benzeri mantar türü olan ve mukozalarda fungal lezyonlara sebep olabilen *Candida albicans* (*C. albicans*) üzerine antimikrobiyal etkinlikleri incelenmiştir. Kitosanın molekül ağırlığının artmasıyla viskozitenin de arttığı gözlenmiştir. TAC ilavesi formülasyonların viskozitesini etkilemiştir. Bütün formülasyonlar benzer uzatılmış salım göstermiştir. Suda çözünen protasan klorür formülasyonu ile sırasıyla

2 ve 4 saat sonunda % 4.9 ve % 14.8, baz kitosan formülasyonu (S 01) ise % 5.5 ve % 16.6 salım elde edilmiştir. Formülasyonların mukoadezif özellikleri incelendiğinde farklı özellikteki kitosanların (molekül ağırlığı, çözünürlük, elde edildiği kaynak) farklı mukoadezyon gösterdiği bulunmuştur. Hazırlanan kitosan jellerin seçilen tüm mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisinin olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, hem mukoadezif özelliği nedeniyle uygulanan ilacın ortamdaki uzaklaşmasını engelleyecek hem de kendisinin antimikrobiyal etkisi sayesinde HIV enfeksiyonlarında görülen OML'nin tedavisi için uygun bir formülasyon geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: oral lezyon, mukozal ilaç uygulaması, triamsinolon asetonit

## ABSTRACT

**Öner, Z. G. Development of Non-invasive Delivery Systems for Treatment of HIV Related Oral Lesions, Hacettepe University Health Sciences Institute, Master Thesis in Pharmaceutical Technology Program, Ankara, 2011.**

Oral mucosal lesions (OML) are the earliest and the most important indicators of the HIV infection. Most of the common lesions associated with HIV are candidiasis, hairy leukoplakia, Kaposi sarcoma, linear gingival erythema, necrotizing ulcerative gingivitis and periodontitis, non-Hodgkin lymphoma. The presence of oral lesions can have a significant impact on health-related quality of life. Topical steroids are the most widely used treatment of OML, however the desired action is still not fully obtained with the current local drug treatment. Salivation and resulting swallowing effectively removes the drug from the preferred action site. Novel bioadhesive formulations are being explored for better delivery which enables the drug remain on the application site longer hence increasing the availability. Being a non-toxic, non-allergenic, biocompatible, biodegradable and bioadhesive polymer, chitosan has been widely studied for oral mucosal delivery. Furthermore, its biological activities such as antimicrobial, hemostatic, wound healing, tissue regeneration make chitosan favorable for the treatment of lesions in the oral cavity. In this study, gel formulations for delivery of triamcinolone acetonide (TAC), which is a long-acting synthetic glucocorticoid, and the most preferred drug for the treatment of HIV-related oral mucosal lesions, were developed using chitosan with different source and properties such as molecular weight and solubility. TAC was incorporated into the gels at 0.1 % w/v concentration. The formulations were investigated in vitro in regard to viscosity and release properties as well as bioadhesive properties. In addition, antimicrobial activity of the formulations was evaluated against *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) as bacterial strains which causes periodontal/mucosal lesions and a yeast-like fungi *Candida albicans* (*C. albicans*) which causes mucosal fungal lesions. Viscosity was found to increase with increasing molecular weight of chitosan. Incorporation of TAC was found to affect the viscosity of the formulations. With all formulations similar prolonged release profiles were obtained. The percent released with water soluble chitosan in 2h and 4h was 4.9 % and 14.8 %, respectively.



respectively, and for base chitosan was 5.5 % in 2h and 16.6 % in 4h. Mucoadhesion was found to be affected by different properties of chitosan such as molecular weight, solubility, and source. Chitosan gels were shown to be effective on all of the investigated microorganisms. In conclusion, formulations which avoid removal of the drug from the application site due to their mucoadhesive properties and which are suitable for the treatment of oral mucosal lesions caused by HIV infections due to their own antimicrobial activities were developed.

Keywords: oral lesion, mucosal drug delivery, triamcinolone acetonide

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Oral Kavite	3
1.1.1. Oral Mukozanın Yapısı ve Özellikleri	4
1.1.1.1. Epiteldeki Bariyerler	7
1.1.1.2. Bukkal Mukozadan İlaç Geçiş Yolları	8
1.1.1.2.1. Transselüler Yol	8
1.1.1.2.2. Paraselüler Yol	8
1.2. HIV Enfeksiyonlarında Görülen Oral Mukozal Lezyonlar	9
1.2.1. Oral Lezyonların Tedavisi	10
1.2.1.1. Topikal Tedavi	10
1.2.1.2. Sistemik Tedavi	10
1.3. Triamsinolon Asetonit	11
1.3.1. Molekül Formülü	11
1.3.2. Fiziksel Özellikleri	12
1.4. Oral Kaviteye Uygulanacak İlaç Taşıyıcı Sistemler	12
1.4.1. Konvansiyonel Dozaj Şekilleri	12
1.4.2. Biyoadezif Dozaj Şekilleri	12
1.5. Biyoadezyon	12
1.5.1. Biyoadezyon Teorileri	13
1.5.2. Mukoadezif Polimerlerin Sınıflandırılması	15
1.5.3. Mukoadezyona Etki Eden Faktörler	16

	Sayfa	
1.6.	Penetrasyon Arttırıcılar	18
1.6.1.	Penetrasyon Arttırıcıların Sınıflandırılması	18
1.7.	Kitosan	19
1.7.1.	Kitosanın Oral Mukozal Taşıyıcı Sistemlerde Uygulamaları	23
1.7.1.1.	Jel	23
1.7.1.2.	Film	24
1.7.1.3.	Sünger	24
1.7.1.4.	Mikropartiküler Sistem	25
1.7.1.5.	Tablet	25
1.8.	Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	26
2.	DENEYSEL	29
2.1.	Araç ve Gereçler	29
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
2.1.2.	Kullanılan Aletler	30
2.2.	Yöntemler ve Deneyler	31
2.2.1.	Etkin Maddeye Ait Çalışmalar	31
2.2.1.1.	UV Spektrumu	31
2.2.1.2.	TAC'ın Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	31
2.2.1.3.	Analitik Yöntemin Validasyonu	32
2.2.1.3.1.	Doğrusallık	32
2.2.1.3.2.	Doğruluk	32
2.2.1.3.3.	Kesinlik	33
2.2.1.3.3.1.	Tekrar Edilebilirlik	33
2.2.1.3.3.2.	Tekrar Elde Edilebilirlik	33
2.2.1.3.4.	Stabilite	34
2.2.1.3.5.	Özgünlük	34
2.2.2.	Formülasyon Geliştirme	34
2.2.2.1.	Jellerin Karakterizasyonu	36
2.2.3.	İn Vitro Çalışmalar	37
2.2.3.1.	Etkin Madde Salımı	37

	Sayfa	
2.2.4.	Mukoadezyon Çalışmaları	38
2.2.5.	Mikrobiyolojik Çalışmalar	40
3.	BULGULAR	43
3.1.	Etkin Maddeye Ait Çalışmalar	43
3.1.1.	UV Spektrumu	43
3.1.2.	TAC'ın Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	44
3.1.2.1.	Analitik Yöntemin Validasyonu	44
3.1.2.1.1.	Doğrusallık	44
3.1.2.1.2.	Doğruluk	45
3.1.2.1.3.	Kesinlik	46
3.1.2.1.3.1.	Tekrar Edilebilirlik	46
3.1.2.1.3.2.	Tekrar Elde Edilebilirlik	47
3.1.2.1.4.	Stabilite	48
3.1.2.1.5.	Özgünlük	49
3.1.3.	Formülasyon Geliştirme	49
3.1.4.	İn Vitro Salım Çalışmaları	56
3.1.5.	Mukoadezyon Çalışmaları	58
3.1.6.	Mikrobiyolojik Çalışmalar	79
4.	TARTIŞMA	85
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	97
	KAYNAKLAR	98
	ÖZGEÇMİŞ	107

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

OML	Oral Mukozal Lezyon
TAC	Triamsinolon Asetonit
Chx	Klorheksidin Glukonat
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HIV	İnsan İmmün Yetersizlik Virüsü
AIDS	Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu
MA	Molekül Ağırlığı
DD	Deasetilasyon Derecesi
pKa	Asit-baz Disosiyasyon Sabiti
SS	Standart Sapma
VK	Varyasyon Katsayısı
BH	Bağlı Hata
SLS	Sodyum Lauril Sülfat
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MFK	Minimum Fungisidal Konsantrasyon
SDA	Sabourraud Dekstroz Agar
SDB	Sabourraud Dekstroz Broth

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa	
Şekil 1.1.	Oral mukozal sistemlerden ilaç salımı	3
Şekil 1.2.	Oral kavitenin genel yapısı	6
Şekil 1.3.	Deri, bukkal mukoza ve ince bağırsak yapısı	6
Şekil 1.4.	a) keratinize epitel yapısı b) non-keratinize epitel yapısı	7
Şekil 1.5.	Mukozadan geçiş yolları	8
Şekil 1.6.	Triamsinolon asetonitin molekül formülü	11
Şekil 1.7.	Kitinin elde edilmesi	19
Şekil 1.8.	Kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapısı	20
Şekil 1.9.	Antimikrobiyal duyarlılık testleri	26
Şekil 1.10.	Disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık testi	27
Şekil 1.11.	Antimikrobiyal konsantrasyonunun tüpte hazırlanışı	28
Şekil 2.1.	Kitosan jel formülasyonlarının hazırlanması	36
Şekil 2.2.	Franz difüzyon hücresi	38
Şekil 2.3.	a) TA-XT Plus tekstür analiz aleti, b) platform ve c) rig	38
Şekil 2.4.	Tekstür analiz aleti ile elde edilen kuvvet-zaman eğrisi	39
Şekil 3.1.	TAC'ın mobil faz içindeki UV spektrumu	43
Şekil 3.2.	TAC'a ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ait HPLC kromatogramı	44
Şekil 3.3.	TAC'ın kalibrasyon doğrusu	45
Şekil 3.4.	a) Boş ve b) etkin madde içeren jelden in vitro salım çalışması sırasında elde edilen HPLC kromatogramları	49
Şekil 3.5.	Aynı konsantrasyonda (%2) düşük (S), orta (M) ve yüksek (L) molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış a) boş ve b) etkin madde içeren jellerin akış eğrileri	52
Şekil 3.6.	Jellerin akış eğrileri a) boş ve b) etkin madde içeren	53
Şekil 3.7.	Aynı konsantrasyonda (%2) düşük (S), orta (M) ve yüksek (L) molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış a) boş ve b) etkin madde içeren jellerin viskozite eğrileri	54
Şekil 3.8.	Jellerin viskozite eğrileri a) boş ve b) etkin madde içeren	55

	Sayfa
Şekil 3.9. Orta molekül ağırlıklı (M) kitosan jelin difüzyon hücrelerinden salımı üzerine salım ortamına eklenen farklı yüzey etkin maddelerinin etkisi	56
Şekil 3.10. Jellerden triamsinolon asetonitin salım profilleri	57
Şekil 3.11. Düşük (% 2 S), orta (% 2 M) ve yüksek (% 2 L) molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış etkin madde içermeyen jellerin farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi	58
Şekil 3.12. Boş (S) ve etkin madde içeren (S 01) düşük molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri	59
Şekil 3.13. Boş (S) ve etkin madde içeren (S 01) düşük molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi	60
Şekil 3.14. Boş (M) ve etkin madde içeren (M 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri	61
Şekil 3.15. Boş (M) ve etkin madde içeren (M 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi	62
Şekil 3.16. Boş (L) ve etkin madde içeren (L 01) yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri	64
Şekil 3.17. Boş (L) ve etkin madde içeren (L 01) yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi	65
Şekil 3.18. Boş (Sig) ve etkin madde içeren (Sig 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri	67

	Sayfa
Şekil 3.19. Boş (Sig) ve etkin madde içeren (Sig 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadazyon işi	68
Şekil 3.20. Boş (P) ve etkin madde içeren (P 01) suda çözünen protasan klorür için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri	69
Şekil 3.21. Boş (P) ve etkin madde içeren (P 01) suda çözünen protasan klorür için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadazyon işi	70
Şekil 3.22. Boş (P-B) ve etkin madde içeren (P-B 01) baz protasan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri	71
Şekil 3.23. Boş (P-B) ve etkin madde içeren (P-B 01) baz protasan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadazyon işi	72
Şekil 3.24. Boş (K) ve etkin madde içeren (K 01) mantar kaynaklı kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri	73
Şekil 3.25. Boş (K) ve etkin madde içeren (K 01) mantar kaynaklı kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadazyon işi	74
Şekil 3.26. Jellerin adezyon işi a) boş ve b) etkin madde içeren	75
Şekil 3.27. Boş kitosan jellerin, % 0.1 ve 0.2'lik Chx solüsyonlarının <i>C. albicans</i> için disk difüzyonla belirlenen inhibisyon bölgesi çap değerleri	79
Şekil 3.28. Boş kitosan jellerin, % 0.1 ve 0.2'lik Chx solüsyonlarının <i>P. gingivalis</i> için disk difüzyonla belirlenen inhibisyon bölgesi çap değerleri	81
Şekil 3.29. Boş kitosan jellerin, % 0.1 ve 0.2'lik Chx solüsyonlarının <i>A. actinomycetemcomitans</i> için disk difüzyonla belirlenen inhibisyon bölgesi çap değerleri	83



## TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 1.1.	Mukoadezif polimerlerin sınıflandırılması	15
Tablo 1.2.	Penetrasyon arttırıcılar	18
Tablo 2.1.	TAC'ın HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar	31
Tablo 2.2.	Formülasyonlarda kullanılan kitosanlar	35
Tablo 2.3.	Geliştirilen jel formülasyonları	35
Tablo 3.1.	Gün içi ve günler arası doğruluk	46
Tablo 3.2.	Tekrar edilebilirlik sonuçları	47
Tablo 3.3.	Gün içi ve günler arası kesinlik	48
Tablo 3.4.	Analitik yöntemin validasyonunda TAC'a ait stabilite sonuçları	48
Tablo 3.5.	Jellerin organoleptik özellikleri	50
Tablo 3.6.	Jellerin pH ve zeta potansiyel değerleri	50
Tablo 3.7.	Jellerin viskozite değerleri	51
Tablo 3.8.	Kitosan jellerin mukoadezif özellikleri	77
Tablo 3.9.	Kitosan jellerin <i>C. albicans</i> için MİK değerleri	80
Tablo 3.10.	Kitosan jellerin <i>P. gingivalis</i> için MİK değerleri	82
Tablo 3.11.	Kitosan jellerin <i>A. actinomycetemcomitans</i> için MİK değerleri	84

## GİRİŞ ve AMAÇ

Edinsel immün yetmezlik sendromu (AIDS), dünyada özellikle gelişmekte olan ülkelerde en önemli halk sağlığı sorunları içinde yer alan ve insan immün yetersizlik virüsü (HIV) enfeksiyonu nedeniyle gelişen bir hastalıktır (1). HIV enfeksiyonunun ağız sağlığı üzerinde önemli olumsuz etkileri vardır. HIV pozitif hastaların % 40-50'sinde hastalığın erken döneminde oral bakteriyel, fungal veya viral enfeksiyonlar gelişmektedir (2). Ağız içinde meydana gelen yaralar HIV virüsü ile ilgili uyarı işaretleri arasında kabul edilmekte ve AIDS tanısının konulmasında yardımcı olmaktadır (3). HIV enfeksiyonunda immün sistemin baskılanması sonucu en sık görülen oral lezyonlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (4,5):

- Fungal enfeksiyonlar (Kandidiyazis vb.)
- Bakteriyel enfeksiyonlar (Gingivitis, Periodontitis vb.)
- Viral enfeksiyonlar (Herpes simpleks, Herpes zoster, Human papilloma virüsü, Sitomegalovirüs, Oral tüylü lökoplaki)
- Neoplastik hastalıklar (Kaposi sarkomu, Non-Hodgkin lenfoma, Skuamöz hücreli karsinoma)
- Diğer (Rekürrent aftöz ülser, İmmün trombositopenik purpura, Tükrük bezi hastalıkları)

Genellikle oral lezyonların tedavisinde kullanılan topikal ilaçlarla uygulama bölgesinde istenen etkinlikte tedavi sağlanamamaktadır. Bunun nedenleri arasında dozaj şeklinin uygulama sırasında tükrük salgısı, dil ve ağız hareketi, yutma nedeniyle ortamdaki uzaklaştırılması vardır. İlaç etkinliğini arttırabilmek için, formülasyonun uygulama yerinde daha uzun süre kalarak ilacın istenen süre ve miktarda salımını sağlaması gerekir. Bunun için de ilaç taşıyıcı sisteminin mukozaya tutunması gerekmektedir. Bu amaçla mukoadezyondan yararlanılarak mukoadezif özellikte formülasyonlar hazırlanmaktadır. Oral kaviteye lokal olarak uygulanacak ilaçların etkin olması ve fizyolojik mekanizmalara karşı dayanıklı olması gerekmektedir. Ayrıca uygulama sıklığını azaltmak, hasta uyuncunu geliştirmek için ilacın uzatılmış salımı sağlanmalıdır. İlacın mukozanın katmanlarına ulaşması için iyi penetrasyon özelliklerine sahip olması gerekmektedir (6,7).

Bu çalışmada oral mukozal lezyonların tedavisinde kullanılacak mukoadezif bir sistemin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için non-toksik, non-alerjenik olmasının yanı sıra, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması nedeniyle kitosan seçilmiştir. Ayrıca kitosan ilaç geçirgenliğini arttırıcı, yara iyileştirici, doku rejenerasyonu sağlayıcı, antimikrobiyal, hemostatik, antiviral ve immünojenik aktivite gibi biyolojik özellikler göstermektedir. Farklı özellikte kitosanlar (molekül ağırlığı, çözünürlük, elde edildiği kaynak) kullanılarak jel formülasyonları hazırlanmıştır.

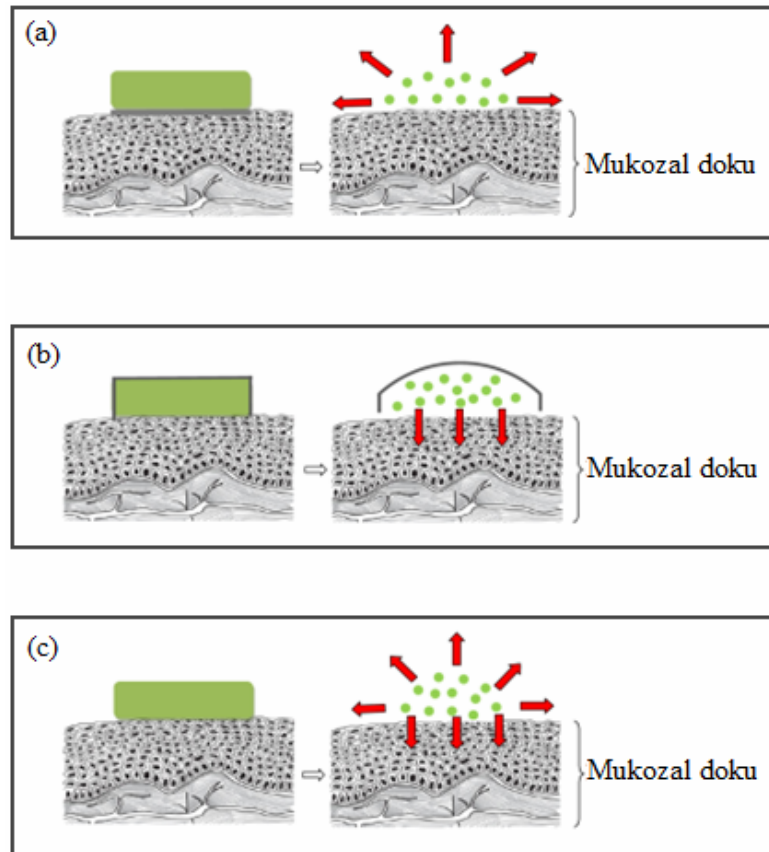
Etkin madde olarak ağız içi ülseratif hastalıkların inflamasyon kontrolünde yaygın kullanılan bir kortikosteroid olan triamsinolon asetonit seçilmiştir. Geliştirilen formülasyonların karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra viskozite, salım ve biyoadezif özellikleri incelenmiştir. Ayrıca kitosan formülasyonlarının antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Oral Kavite

Oral kavite önde dudaklar, yan tarafta yanaklar, arkada ön tonsil plikaları, altta ağız tabanı, üstte sert ve yumuşak damak, altta dil ve ağız tabanı denilen kas ve zarlardan yapılmış yumuşak bir duvarla sınırlanmış boşluktur. Oral kavitenin arka kısmı, ön tonsil plikalarından başlayan orofarinkse açıktır (8).

Oral kavite yoluyla ilaç uygulaması uzun zamandan beri ilgi çekmekte ve her geçen gün önem kazanmaktadır. Bu yolla hem mukozal hem de transmukozal ilaç uygulaması mümkündür. Birinci durumda amaç mukoza yüzeyinde bölgeye özel bir ilaç salımı elde etmektir, oysaki ikinci durumda ilacın mukozadan absorpsiyonu ve sistemik ilaç uygulanması söz konusudur (9,10).



**Şekil 1.1.** Oral mukozal sistemlerden ilaç salımı a) oral kavite içine-tek yönlü

b) mukoza içinden-tek yönlü c) oral kavite ve mukoza içine-çok yönlü (10)

Konvansiyonel yollara oranla oral mukozadan ilaç uygulanması hem sistemik hem de lokal etki için birtakım üstünlüklere sahiptir. Oral mukozal ilaç uygulamasının üstünlükleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir (9,11,12):

- Rahatlıkla ulaşılabilen bir bölge olup hasta uyuncu yüksek
- Girişimsel değil
- İstenildiği anda tedavinin kesilmesi
- Oldukça vaskularize bir doku ve kan damarları doğrudan juguler vene açılır
- Hepatik ilk geçiş etkisi önlenir
- Gastrointestinal kanalda enzim ve asit degradasyonu önlenir
- Absorbe olan ilaç doğrudan sistemik dolaşıma katılır
- İlaç absorpsiyonu açlık veya tokluktan etkilenmez

Oral mukozal ilaç uygulamasının sakıncaları ise aşağıdaki şekildedir;

- Bağırsak, rektum ve vajinaya oranla toplam yüzey alanı küçük ve geçirgenliğinin az olması
- Tükrük salgısı ile ilacın dilüe olması
- Dil, ağız hareketi ve yutma nedeniyle ilacın uygulama bölgesinden uzaklaştırılması

### 1.1.1. Oral Mukozanın Yapısı ve Özellikleri

Oral mukozanın yapısına değinmeden önce konu içinde geçecek olan ve çoğu zaman birbiriyle değişimli olarak kullanılan bazı terimlerin kısa tanımlamaları verilmiştir.

*Ağız boşluğu:* Dudakları, yanak içini, yumuşak ve sert damağı, ağız tabanını içeren ağız bölgesi olarak tanımlanmaktadır.

*Ağız mukozası (Oral mukoza):* Sublingual ve bukkal mukoza, gingiva (diş eti), damak ve dudak mukozasını içeren, oral boşluğu kaplayan membranlardır.

*Bukkal mukoza:* Oral kavitenin her iki yanında yanağın iç yüzünü kaplayan mukozadır.

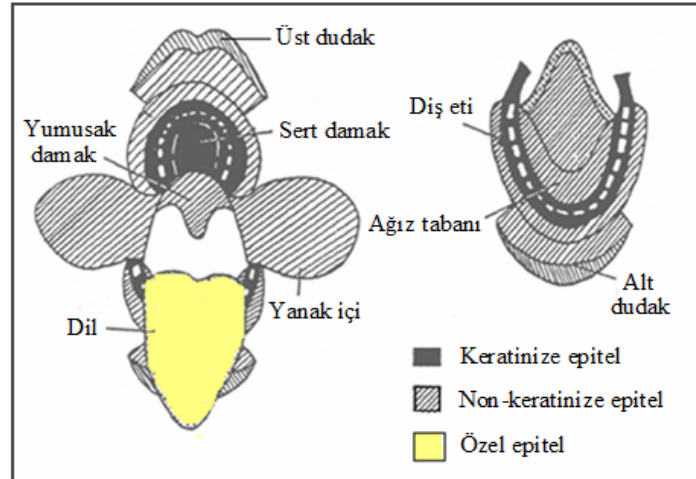
*Oral mukozal ilaç taşıyıcı sistem:* Lokal olarak ağız mukozasına etkili ya da bu mukoza yolu ile verildiğinde sistemik etkiye sahip ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

*Bukkal ilaç taşıyıcı sistemler:* Lokal veya sistemik etki için bukkal mukozaya uygulanan ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

Oral kaviteyi saran mukoza bağ dokusu ile desteklenen stratifiye skuamöz epitel yapısındadır. Şekil 1.2’de oral kavite içerisinde değişik tipteki epitelin dağılımı şematik olarak gösterilmiştir. Oral kavitenin farklı bölgelerinde oral mukoza üç farklı histolojik tip gösterir (13):

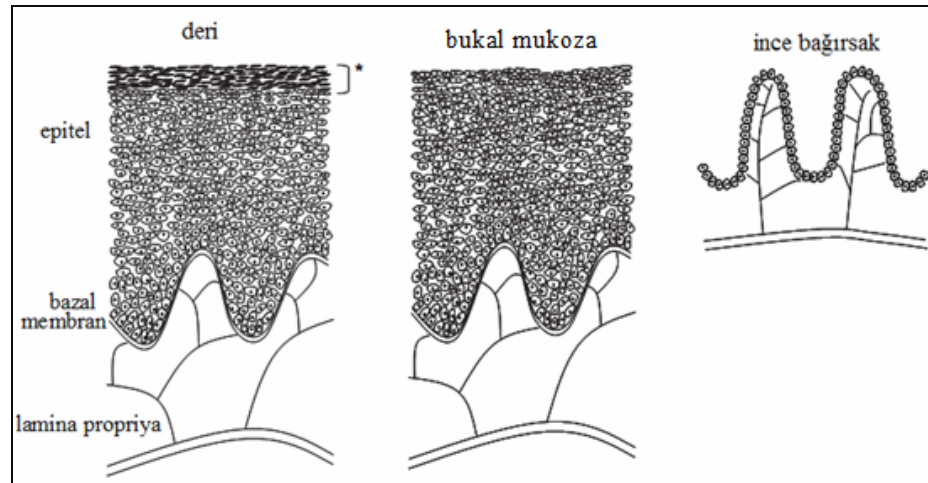
1. Çiğnemeye bağlı mekanik kuvvetlere maruz kalan diş eti ve sert damak gibi bölgeler, deriyi kaplayan epidermis benzeri keratinize epitel ile kaplıdır. Bu epitel, kollajen bağ dokusu ya da lamina propria ile alttaki dokulara sıkıca bağlanır.
2. Çiğneme ve konuşmaya uyum sağlamak için, bukkal bölge ve ağız tabanı esnek yapıda olmalıdır. Bu bölgeler özefagus ya da uterus serviksine benzer şekilde non-keratinize epitel ile kaplıdır, bu bölgedeki mukozanın bağ dokusu daha elastik ve esnektir.
3. Dilin dorsum bölgesi ise, keratinize ve non-keratinize epitelden oluşan özel bir epitel ile kaplıdır ve bu epitel dil kasına sıkıca bağlıdır.

Ağız mukozasının toplam yüzeyinin yaklaşık % 25’ini keratinize, % 60’ını non-keratinize epitel ve % 15’ini ise özel epitel oluşturmaktadır. Maddelerin ağız duvarından penetrasyonu değişik mukozaların hem anatomik yapısına hem de relatif alanlarına bağlıdır (8).



**Şekil 1.2.** Oral kavitenin genel yapısı

Bukkal mukoza deriye oranla daha fazla, bağırsağa oranla ise daha az geçirgenliğe sahiptir. Bu durum sadece bağırsak yüzey alanının büyük olmasından değil aynı zamanda dokular arasındaki yapısal farklılıklardan da kaynaklıdır (Şekil 1.3). Deri ve bukkal mukozayı kaplayan stratifiye skuamöz epitele göre ince bağırsağı kaplayan basit kolumnar epitel ilaç geçişine daha az direnç göstermektedir.



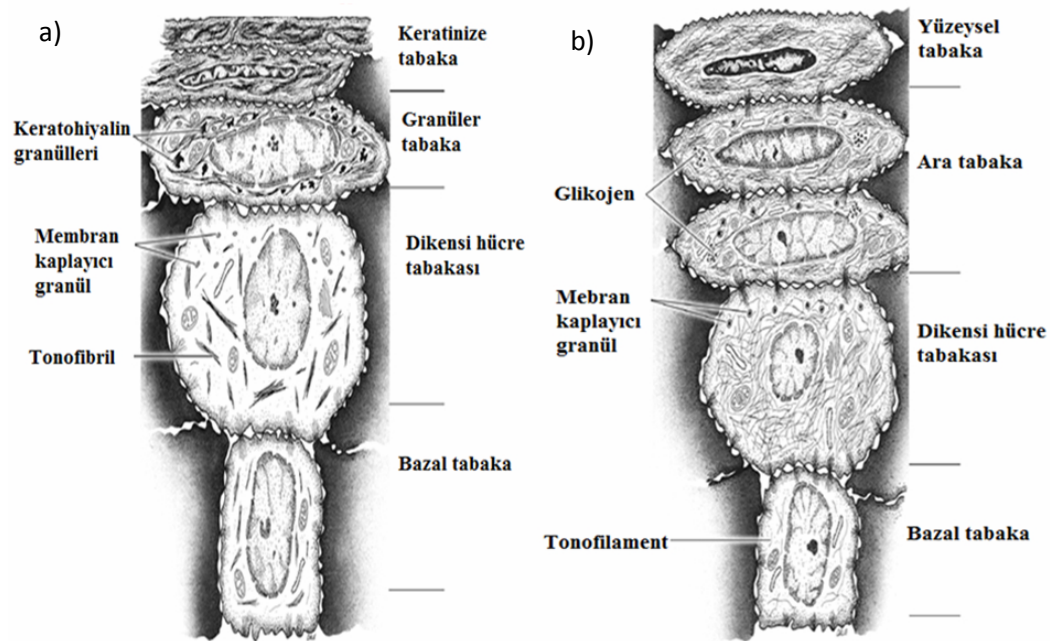
\* stratum korneum

**Şekil 1.3.** Deri, bukkal mukoza ve ince bağırsak yapısı (14)

Bukkal mukoza epitelinde keratinize epitel bulunmaz. Non-keratinize bukkal mukozanın en üst tabakası, çekirdeklerini ve bazı sitoplazmik fonksiyonlarını taşıyan hücrelerden oluşmaktadır; ve çapraz bağlı protein zarfıyla çevrelenmiştir.

### 1.1.1.1. Epiteldeki Bariyerler

Keratinize olsun olmasın neredeyse bütün stratifiye skuamöz epitellerde, membran kaplayıcı granüller gözlenmektedir. Yaklaşık 2 µm çapındaki bu küçük granüller dikensi hücre tabakasının golgi keseciklerinde oluşup epitel yüzeyine doğru hareket ederler ve hücre membranını ile füzyona uğrarlar. Hücre membranıyla füzyon sırasında membran kaplayıcı granüller içindekileri interselüler boşluğa bırakırlar (Şekil 1.4).



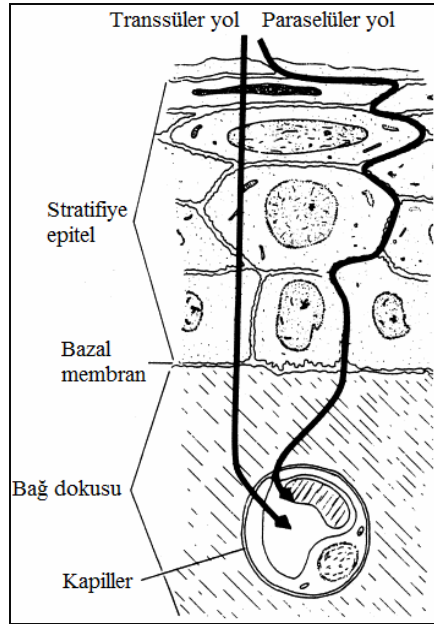
**Şekil 1.4.** a) keratinize epitel yapısı b) non-keratinize epitel yapısı (12)

Lipit lamellar yapı, keratinize epitel dokuda membran kaplayıcı granüller içinde bulunur. Stratum korneumun hücreler arası boşluğu kısa lipit lamellar dizileriyle doldurulmuştur, bu diziler çeşitli lipit çifte tabakalarını oluşturur. Non-keratinize epitel dokudaki membran kaplayıcı granüller düzensiz yapı oluştursa bile son çalışmalarda bu granüllerin az miktarının lamellar içerdiği bulunmuştur. Sonuç olarak; non-keratinize epitel dokunun yüzeysel tabakasındaki hücreler arası boşluklar non-lamellar sıvı lipit faz özelliği gösterir. Keratinize epitel dokuya kıyasla, yabancı bileşiklere karşı daha büyük geçirgenlik gözlenmiştir. Bunun nedeni bukkal mukozanın hücreler arası boşluğundaki düzenli lipit lamelların olmamasıdır (15).



### 1.1.1.2. Bukkal Mukozadan İlaç Geçiş Yolları

Genel olarak, bukkal epitelde maddelerin geçişi pasif difüzyon ile gerçekleşmektedir. Burada interselüler boşluklardan (paraselüler) ya da intraselüler (transselüler) difüzyon söz konusudur (16) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Mukozadan geçiş yolları

#### 1.1.1.2.1. Transselüler Yol (Hücre içinden geçiş)

Polar ve lipit yapıdaki hücre membranından madde geçişi transselüler yol olarak adlandırılır. İlacın lipofilik olması durumunda geçiş transselülerdir.

#### 1.1.1.2.2. Paraselüler Yol (Hücreler arasından geçiş)

Lipit yapıdaki hücre dışı boşluktan madde geçişi paraselüler yol olarak adlandırılır. Özellikle hidrofilik yapıda ve proteinler gibi yüksek moleköl ağırlığına sahip bileşiklerin geçişinde ekstraselüler boşluğun lipit matriksi paraselüler geçiş için bariyer özellik gösterir.

Sistemik dolaşıma ulaşabilmesi için ilaçların mukoza ve yüzeyindeki enzimlerin oluşturduğu enzimatik bariyeri de aşması gerekmektedir. Yine de bu enzimatik bariyer gastrointestinal kanalından daha az etkilidir. Aminopeptidaz, karboksipeptidaz ve esterazlar; insan bukkal epitel hücre kültürü ya da insan/domuz bukkal mukoza homojenatında bulunmuştur. Buna rağmen, doku homojenatlarının kullanımını membran ve sitoplazmik enzimleri ayırmaya olanak vermemektedir. Geçiş yoluna bağlı olarak, transselüler ya da paraselüler, ilacın yukarıda sözü geçen enzimlerden bazılarıyla karşılaşması muhtemeldir. Özellikle, bukkal epitelden paraselüler yolla geçen peptitler yalnızca ekstraselüler enzimlerle temas etmektedir. Önceki çalışmalar aminopeptidazların bukkal mukozada önemli olduğunu göstermekte ve bukkal epitel hücrelerinin altındaki proteazların mukoza yüzeyinde proteolitik aktiviteyi temsil ettiğini varsaymaktadır. Bu tür enzimlerin peptitlerin verilisinde başlıca metabolik bariyeri oluşturduğu sonucuna varılmıştır (8).

## **1.2. HIV Enfeksiyonlarında Görülen Oral Mukozal Lezyonlar**

AIDS, dünyada özellikle gelişmekte olan ülkelerde en önemli halk sağlığı sorunları içinde yer alan ve immün yetersizlik virüs (HIV) enfeksiyonu nedeniyle gelişen bir hastalıktır. Oral lezyonlar AIDS hastalarında sıklıkla karşılaşılan bir sorundur. Oral lezyonlar, çoğu hastada HIV enfeksiyonunun belirtisi olabileceği gibi enfeksiyonun erken klinik tanıları arasında yer almakta, böylece HIV hastalığının AIDS'e ilerlemesi öngörülebilmektedir. Bu nedenle oral lezyonlar, tedavi ve aşı çalışmalarının başında ve sonunda kullanılabilir; fırsatçı enfeksiyonlarla anti-HIV tedavinin belirleyici faktörü olabilir; evrelendirme ve sınıflandırma sistemi olarak kullanılabilirler (5). Şiddet ve özelliğine göre AIDS'e bağlı üç grup oral lezyon tanımlanmıştır (4);

Grup 1 HIV enfeksiyonuyla şiddetle ilişkili başlıca yedi lezyondan oluşmaktadır. Oral kandidiyaz, tüylü lökoplaki, kaposi sarkomu, linear gingival eritem, nekrotizan ülseratif gingivitis, nekrotizan ülseratif periodontit ve non-Hodgkin lenfoma.

Grup 2 atipik ülserleri, tükürük bezi hastalıkları ve viral enfeksiyonları (sitomegalovirüs, herpes simpleks, papillomavirüs ve herpes zoster) içermektedir.

Grup 3'teki osteomyelit ve skuamöz hücreli karsinom gibi lezyonlar birinci ve ikinci gruptakilere göre daha nadir gözlenmektedir.

Oral lezyonların varlığı hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir.

### **1.2.1. Oral Lezyonların Tedavisi**

Kortikosteroidler vezikülo-eroziv lezyonların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Ancak sistemik kortikosteroidlere bağlı yan etkilerin sıklık ve şiddeti topikal kortikosteroidlerin kullanımını arttırmıştır (17).

Oral lezyonların tedavisinde topikal ya da sistemik tedavi uygulanmaktadır (18-20).

#### **1.2.1.1 Topikal Tedavi**

Topikal tedavide kullanılan ilaçlar:

- *Topikal kortikosteroid* (triamsinolon asetonit, deksametazon, betametazon)
- *Antimikrobiyal* (klorheksidin glukonat, nistatin)
- *Antifungal* (klotrimazol)

#### **1.2.1.2 Sistemik Tedavi**

Sistemik tedavide kullanılan ilaçlar:

- *Kortikosteroid* (prednizolon)
- *Antimikrobiyal* (tetrasiklin)
- *Antimikotik* (flukonazol)
- *Antifungal* (ketokonazol)
- *Antiviral* (asiklovir)

### 1.3. Triamsinolon Asetonit

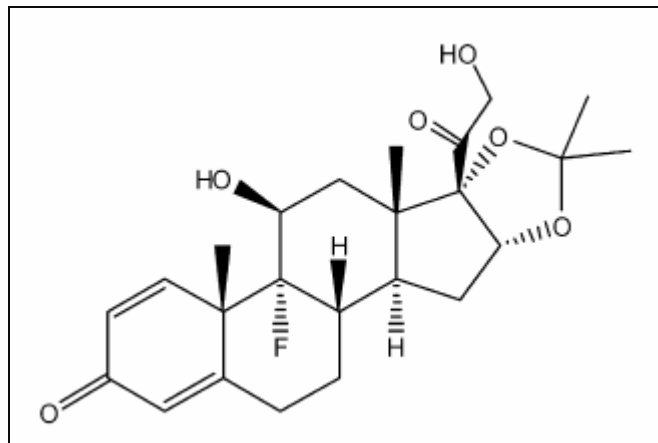
Triamsinolon asetonit, triamsinolon'un türevidir. Triamsinolon ve türevleri antiinflamatuvar ve immünosüpresif olarak kullanılan sentetik glukokortikoidlerdir. Kortikosteroidlerin antialerjik etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, alerjiye karşı çok etkili oldukları bilinmektedir. Triamsinolon asetonitin oral, nazal, parenteral, topikal aerosol formları bulunmaktadır.

AIDS hastalarının ağız içerisinde görülen mukozal lezyonların tedavisinde kortikosteroidlerin antiinflamatuvar etkilerinden faydalanılmaktadır. Kortikosteroidler en güçlü antiinflamatuvar ilaçlardır. Lipokortin (makrokortin) sentezini artırıp fosfolipaz A2 enzimini inhibe ederler, bu şekilde araşidonik asit ve türevlerinin sentezini azaltırlar. Lizozomal membranları stabilize ederler. Proinflamatuvar sitokinler olan TNF alfa ve IL-1 sentezini inhibe ederler. Selektin artışını önleyerek lökosit göçünü azaltırlar. İnflamasyon bölgesinde hücre çoğalmasını engelleyerek onarım ve nedbeleşmeyi geciktirirler (21).

Türk ilaç piyasasında 5 g'lık tüp şeklinde triamsinolon asetonit (% 0.1 g/g) KENACORT-A Orabase Ağız Pomadı bulunmaktadır.

#### 1.3.1. Molekül formülü

Triamsinolon asetonitin kimyasal yapısı Şekil 1.6' da gösterilmiştir (22).



**Şekil 1.6.** Triamsinolon asetonitin molekül formülü

(9 $\alpha$ -floro-11 $\beta$ .21-dihidroksi-16 $\alpha$ .17 $\alpha$ -izopropilidendioksipregna-1,4-dien-3.20-dion)

Kapalı formülü  $C_{24}H_{31}FO_6$  olup, molekül ağırlığı 434.5' dir.

TAC iyonize olmamaktadır, bu nedenle spesifik bir pKa değeri yoktur (23).

### **1.3.2. Fiziksel Özellikleri**

TAC beyaz veya krem-beyaz renkte hemen hemen kokusuz, kristalize bir tozdur. Pratik olarak suda çözünmez, kloroform ve etanolda biraz çözünür, eterde çok az çözünür. TAC iyi kapatılmış kaplarda saklanmalıdır. Işıktan korunmalıdır (24).

## **1.4. Oral Kaviteye Uygulanacak İlaç Taşıyıcı Sistemler**

### **1.4.1. Konvansiyonel Dozaj Şekilleri**

Bu sistemler oral kavite içerisinde serbest olarak bulunur. Sistemden salınan ilaç oral mukoza ile temas eder. Hızlı çözünen tabletler, sakızlar, pastiller ve çözeltiler bu grupta yer alan ilaç taşıyıcı sistemlerden bazılarıdır.

### **1.4.2. Biyoadezif Dozaj Şekilleri**

Son yıllarda ilacı daha uzun süre ağız içinde tutarak uzun süreli etki elde etmeye yönelik çalışmalar artmıştır. Bu amaçla biyoadezif polimerler kullanılarak farklı ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır (Örn. tablet, film, yama, merhem, krem, jel, toz vd.). Böylece biyoadezyondan yararlanılarak konvansiyonel dozaj şekillerinin sahip olduğu dezavantajları ortadan kaldırmak mümkün olmaktadır (25).

## **1.5. Biyoadezyon**

Adezyon iki yüzeyin bir arada tutulması olarak tanımlanmaktadır. Oluştığı ortama bağlı olarak adezyonun değişik terminolojik adlandırmaları vardır. Biyoadezyon biyolojik yüzeyle polimer arasındaki etkileşim, mukoadezyon ise mukozal membranlarla olan etkileşimlerdir. Başka bir deyişle, biyoadezyon sentetik veya doğal bir polimerin biyolojik bir substrata bağlanması olarak tarif edilebilir. Bu substrat bir muköz tabakaysa tanımlama mukoadezyon şeklinde olur (26). Farmasötik formülasyonlara etkin madde yanında mukoadezif hidrofilik polimerlerin

katılmasıyla mukoadezyondan yararlanılarak bölgeye özgü ilaç uygulaması gerçekleştirilmektedir. Temeli lokalize ilaç uygulaması için formülasyonun biyolojik yüzeyde tutunmasıdır. Etkin madde etki bölgesine yakın salınacak bu nedenle de tedavinin etkinliği artacaktır.

Biyoadezif sistemlerin üstünlükleri aşağıdaki şekilde verilebilir (6,26,27):

1) Adezyon ve sıkı temas sonucunda formülasyon, uygulama bölgesinde daha uzun süre kalabilmekte; böylece tedavide daha düşük doz etkin maddeyle artan etkinlik sağlanmaktadır.

2) Spesifik biyoadezif moleküllerin kullanımı belirli doku veya bölgelere hedeflendirmeye olanak sağlamaktadır.

### 1.5.1. Biyoadezyon Teorileri

Biyoadezyon araştırmaları için uyarlanan 6 genel adezyon teorisi vardır:

*Elektronik teori;* farklı elektronik yapılarından dolayı, adezif polimer ile müsin glikoproteinlerinin yüzey temasından sonra elektron transferi görülür. Ara yüzeyde elektriksel çifte tabaka oluşumu, bunu takiben çekim kuvvetlerinden ötürü adezyon oluştuğu düşünülmektedir.

*Islanma teorisi;* genel olarak sıvı sistemlere uygulanır ve yüzey/arayüzey enerjilerini (gerilim) dikkate alır. Adezyon için, sıvının yüzeye kendiliğinden yayılması gerekmektedir. Bir sıvının yüzeye olan ilgisi temas açısı gonyometri tekniğiyle ölçülebilir. Genel kural olarak düşük temas açısı sıvının katı yüzeye yüksek ilgisini ifade etmektedir. Yayılma katsayısı ( $S_{AB}$ ) katı ve sıvıların yüzey enerjilerinden hareketle aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanabilir:

$$S_{AB} = \gamma_B - \gamma_A - \gamma_{AB}$$

$\gamma_A$  A sıvısının yüzey gerilimi,  $\gamma_B$  B katısının yüzey gerilimi,  $\gamma_{AB}$  ise katı ve sıvının arayüzey gerilimini ifade etmektedir.  $S_{AB}$  katı üzerinde yayılan sıvı için pozitif olmalıdır.

Adezyon işi iki fazı ayırmak için gerekli olan enerjiyi gösterir ve şu eşitlikle belirtilir:

$$W_A = \gamma_A + \gamma_B - \gamma_{AB}$$

Arayüzey enerjisine bağlı olarak katı ve sıvının yüzey enerjilerindeki artış adezyon işinde artışa neden olur.

*Adsorpsiyon teorisi;* van der Waals etkileşimleri veya hidrojen bağı sayesinde adeziv polimerin mukozaya yapışması olarak tanımlanmaktadır. Adeziv etkileşime esas katkıyı bu kuvvetlerin yaptığı düşünülmektedir.

*Difüzyon teorisi;* adeziv bir arayüzey boyunca polimer zincirlerinin penetre olması olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç konsantrasyondaki farklılık sayesinde gerçekleşir ve zincir uzunluğu, hareketliliğinden etkilenmektedir. İnterpenetrasyon yoğunluğu, polimerin difüzyon katsayısı ve temas süresine bağlıdır. Yeterli penetrasyon yoğunluğu yarı kalıcı bir adeziv bağ yaratır.

*Mekanik teori;* sıvı bir adezifin pürüzlü yüzeye kenetlenmesinden adezyonun oluştuğunu varsaymaktadır. Pürüzlü yüzey, etkileşim için geniş bir yüzey alanı sağlamasına rağmen mekanik adezyon için yeterli değildir. Pürüzlü yüzeyde önemli olan pürüzlülüğü yaratan boşlukların doğru bir şekilde doldurulmasıdır. Boşluklarda kalacak hava molekülleri adezyonu olumsuz etkileyebilir.

*Kırılma teorisi;* adeziv direnç açısından diğer beş teoriden ayrılmaktadır. Adezyondan sonra iki yüzeyi birbirinden ayırmak için gereken kuvvetleri inceler. Teori arayüzeyde gerçekleşen adeziv bağın kırılmasını öngörmektedir. İki yüzeyi ayırma zorluğu ile yapışma bağı gücü arasında bağlantı kurmaktadır. Bununla birlikte, kırılma en zayıf parçadan gerçekleşmektedir. Bu kırılma genelde adeziv yüzeylerin birindeki kohezif kopmadır (28).

### 1.5.2. Mukoadezif Polimerlerin Sınıflandırılması

Genel olarak mukoadezif polimerler elde edildiği kaynağa, sudaki çözünürlüklerine, sahip oldukları yüke ve ayrıca biyoadezif bağ oluşum mekanizmasına göre sınıflandırılmaktadır (29,30).

**Tablo 1.1.** Mukoadezif polimerlerin sınıflandırılması

<b>Sentetik</b>	<b>Suda çözünen</b>	<b>Anyonik</b>	PAC, CMC, tiyollenmiş CMC, sodyum CMC, HPMC, metil selüloz, metil hidroksi etil selüloz, karbopol, poliakrilik asit, poliakrilatlar, akrilik asit ve PEG kopolimeri, polimetakrilat, akrilik asit ve etilheksilakrilat kopolimeri, polialkilsiyanoakrilatlar; poliisobutilsiyanoakrilat, poliisoheksilsiyanoakrilat
		<b>Katyonik</b>	Metilvinil eter ve metakrilik asit kopolimeri, poli-2-hidroksietilmetakrilat, Poli-N-2-hidroksipropilmetakrilamit
		<b>Noniyonik</b>	HPC, hidroksi etil selüloz, PEG, PVA, PVP
	<b>Suda çözünmeyen</b>	Etilselüloz, polikarbofil (2'si de anyonik)	
<b>Doğal ve yarı sentetik polimerler</b>	<b>Suda çözünen</b>	<b>Anyonik</b>	Kitosan-EDTA, pektin, sodyum aljinat, hiyaluronik asit, karragenan
		<b>Katyonik</b>	Aminodekstran, dimetilaminoetildekstran, kuaternize kitosan
		<b>Noniyonik</b>	Hidroksillenmiş nişasta
	<b>Suda çözünmeyen</b>	Kitosan, agaroz, jelatin (3'ü de katyonik)	

CMC: karboksimetilselüloz, HPC: hidroksipropilselüloz, HPMC: hidroksipropilmetilselüloz, PEG: polietilenglikol, PVA: polivinilalkol, PVP: polivinilpirolidon, EDTA: etilendiamin tetraasetikasit, PAC: polianyonikselülozik polimer

Ayrıca biyoadezif bağ oluşum mekanizmasına göre de biyoadezif polimerlerin sınıflandırılması yapılmaktadır:

- Kovalan bağ: Siyanoakrilat
- Hidrojen bağı: Akriyatlar, karbopol, polikarbofil, PVA
- Elektrostatik etkileşimler: Kitosan



### 1.5.3. Mukoadezyona Etki Eden Faktörler

Mukoadezyonu etkileyen faktörler aşağıdaki şekilde maddelenebilir (6,29):

#### *Biyoadezif polimere ilişkin faktörler*

##### Molekül ağırlığı

Molekül ağırlığı, zincir uzunluğu ve yapısı mukoadezyonu etkileyen önemli bir parametredir. Düşük molekül ağırlıklı polimerler yüksek molekül ağırlığına göre mukus tabakasına daha iyi nüfuz ederler. Optimum MA  $10^4$  ve  $4 \times 10^6$  dalton arasındadır. Yüksek molekül ağırlıklı polimerler substratla etkileşime girecek serbest grupları ortaya çıkaracak hızlı nemlenmeyi gerçekleştiremez. Lineer polimerler için mukoadezyon gücü molekül ağırlığının artmasıyla artmaktadır. Örneğin PEG 20000, PEG 200000'e göre daha zayıf adezif özellik göstermektedir. PEG'de molekül ağırlığındaki artış zincir uzunluğu dolayısıyla polimerin substrata penetrasyonunu ve substratla etkileşimini arttırmaktadır.

##### Konsantrasyon

Maksimum adezyon için optimum bir polimer konsantrasyonunun olması gerektiği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu sistemlerde, optimum seviyeden sonra, adezif güç önemli ölçüde azalmaktadır; çünkü sarmal yapıdaki polimer zincirleri ortamdan ayrılmakta ve interpenetrasyon için uygun zincirler sınırlı kalmaktadır.

##### Zincir esnekliği

Polimerin hareketliliği ve esnekliği polimer-substrat etkileşmesi açısından önemlidir. Biyoadezif polimer zincirlerin müsinle karışabilmesi için zincir hareketliliği gereklidir. Suda çözünen polimerler çapraz bağlı olduğunda polimerlerde zincir esnekliği azalmakta dolayısıyla da biyoadezyon gücü düşmektedir.

### ***Çevreye ilişkin faktörler***

#### pH

pH, mukus ve iyonik polimerlerin yüzeyindeki yükü etkiler. pH'daki değişiklikler, polipeptitdeki karbohidrat ve amino asit kısımlarındaki fonksiyonel grupların iyonlaşmasında farklılığa neden olur.

#### Temas süresi

Mukus tabakası ve biyoadezif arasındaki temas süresi polimer zincirlerinin şişmesini ve interpenetrasyonunu etkiler. Temas süresi uzadıkça biyoadezif güç de artar. Temas süresi ile adezyon arasında optimum değere kadar doğrusal bir ilişki vardır.

#### Nemlendirme

Nemlendirme mukoadezif polimerin yüzeye yayılması ve makromoleküler ağ oluşturması için gereklidir. Optimum hidrasyon koşullarında maksimum adezyon gözlenir.

#### Şişme

Şişme polimerin kendisi ve çevresel özelliklerle ilişkilidir. Polimer konsantrasyonu, iyonik güç ve ortamdaki su varlığından etkilenmektedir. Biyoadezif polimerin hidrasyonu ve buna bağlı olarak şişmesi yetersiz ise, polimer zincirlerinin hareketli ve yüzeyler arası penetrasyona uygun hale gelmesi mümkün olmaz.

### ***Fizyolojik faktörler***

#### Mukozal hücrelerin yenilenme derecesi

Değişik mukoza tipleri için farklı olmaktadır. Biyoadezif sistemin mukoza yüzeyindeki sürekliliğini sınırlandırır.

#### Doku hareketi

Yiyecek-içecek tüketimi, konuşma, GİK'deki peristaltik hareketler mukoadezyonu olumsuz yönde etkilemektedir.

## 1.6. Penetrasyon Arttırıcılar

Kan dolaşımına girmeden önce etkin maddenin epitel hücrelerinden geçmesi gerekmektedir. Permeabilitenin düşük olması nedeniyle uygulanan ilaçların bukkal mukozadan geçişi istenilen kan düzeylerine ulaşabilecek yeterlilikte olmamaktadır. Mukozal ilaç taşıyıcı sistemlerde ilacın etkinliğini arttırmak için penetrasyon arttırıcılar kullanılmaktadır. Mukozanın ilaca geçirgenliğini arttıran maddeler penetrasyon arttırıcı (permeasyon kolaylaştırıcı, absorpsiyon arttırıcı) olarak bilinir (14,16).

### 1.6.1. Penetrasyon Arttırıcıların Sınıflandırılması

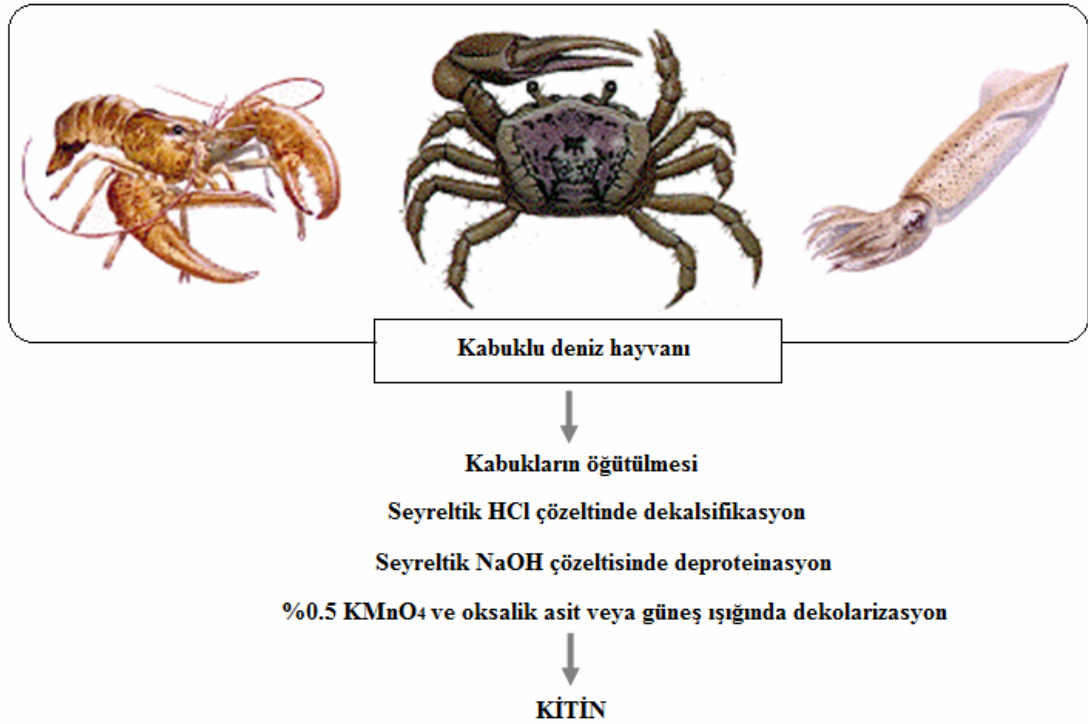
Tablo 1.2’de penetrasyon arttırıcılara ait örnekler ve etki mekanizmaları özetlenmiştir.

**Tablo 1.2.** Penetrasyon arttırıcılar (14,16)

Tip	Mekanizma	Örnek	
Sümfaktanlar	Hücrelerarası lipitlerle etkileşirler, protein düzenini bozarlar	Anyonik	sodyum lauril sülfat, sodyum laurat
		Katyonik	setilpiridinyum klorür
		Noniyonik	poloksamer, Brij, Span, Myrj, Tween
		Safra tuzu	sodyum glikodeoksikolat, sodyum glikolat, sodyum taurodeoksikolat, sodyum tauroklat
		Azon	
Yağ asitleri	Fosfolipitlerin açıl zincirini bozarak akışkanlığını arttırırlar	Oleik asit, kaprilik asit	
Siklodekstinler	Membran bileşenleri ile etkileşirler	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -siklodekstrin, metillenmiş $\beta$ -siklodekstrinler	
Şelat yapıcılar	Ca <sup>+2</sup> ile kompleks oluştururlar	EDTA, sodyum sitrat Poliakrilatlar	
Pozitif yüklü polimerler/ Katyonik bileşikler	Negatif yüklü mukoza yüzeyiyle etkileşirler	Kitosan, trimetil kitosan Poli-L-arjinin, L-lizin	

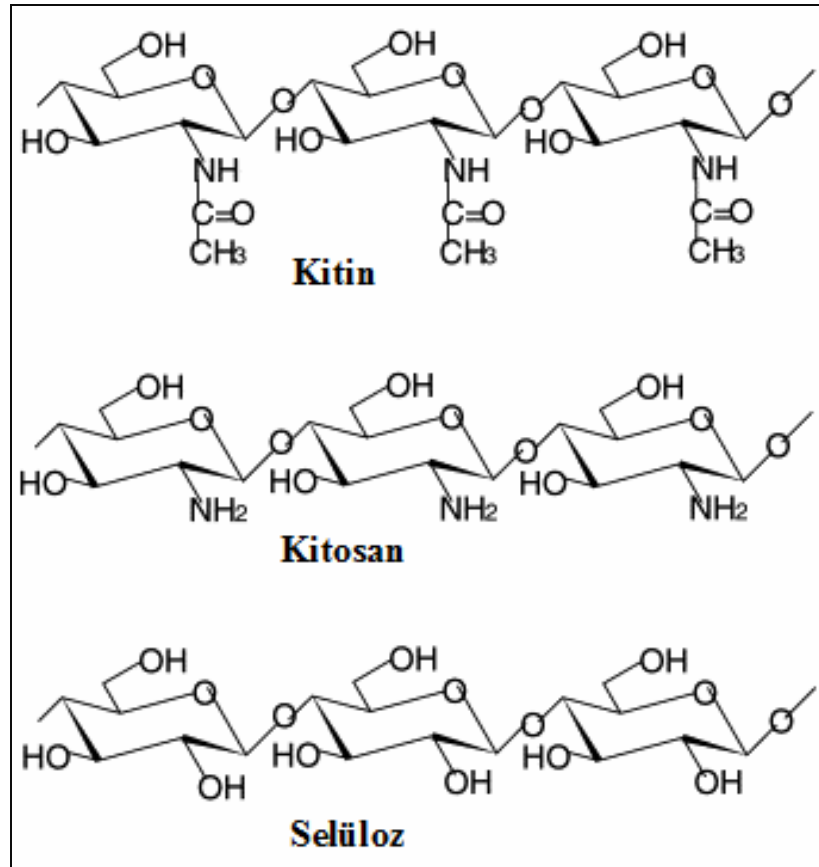
### 1.7. Kitosan

Kitosan; yengeç, karides, ıstakoz gibi eklembacaklıların kabuklarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan ve doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan polimer olan kitinin ( $\beta$ -(1-4)-poli-N-asetil-D-glukozamin) alkali deasetilasyonu ile elde edilen bir polimerdir. Selülozda C-2 karbonundaki hidroksil grubu yerine kitinde asetamido, kitosanda ise amin grubu bulunmaktadır. Dolayısıyla selülozun aksine kitosan pozitif iyon yükü taşımaktadır. Kabuklu deniz hayvanlarından kitinin ekstraksiyonu Şekil 1.7’de verilmiştir.



**Şekil 1.7.** Kitinin elde edilmesi (31)

Kitinin NaOH çözeltisinde deasetilasyonu ile kitosan elde edilmektedir. Şekil 1.8'de kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapısı verilmiştir. Kitosan nötral ve alkali pH'da çözünmez, fakat inorganik ve organik asitlerle suda çözünebilen formlara dönüşür. Asidik ortamda polimerin amino grupları protonlanarak katyonik amin gruplarına dönüşür, böylece molekül pozitif yüklenir. Her glukozamin ünitesinde bir yük olduğundan kitosan yüksek yük dansitesine sahip olup, muköz membranlar gibi negatif yüzeylerle güçlü bir şekilde etkileşir.



**Şekil 1.8.** Kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapısı

Deasetilasyon derecesi, deasetilasyona uğramış N-asetil-D-glukozamin ünitelerinin sayısının toplam ünite sayısına göre miktarını gösterir. % 65-70 veya üzerinde deasetilasyon derecesine sahip kitin kitosan olarak bilinmektedir. Deasetilasyon derecesi kitosanın fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini, bunun sonucu olarak da hazırlanan farmasötik formülasyonların özelliklerini etkiler (32). Kitosan nötral ve alkali pH'da çözünmez; fakat pH değeri 6'nın altında olan dilüe asit çözeltilerinde kolaylıkla çözünebilir. Çözünürlüğünün daha iyi olması ve pek çok kimyasal reaksiyon için aktif bölge olan serbest amin grupları içermesi nedeniyle kitosan kitine tercih edilmektedir (33).

Kitosanın; atık ve suların saflaştırılması, tarım, ziraat, tekstil, kozmetik, gıda endüstrisi gibi çok sayıda alanda uygulaması bulunmaktadır. Kitosanın biyouyumlu, biyoparçalanabilir olmasının yanısıra kendisinin biyoaktif özellikler göstermesi onu farmasötik ve medikal alanda çekici bir polimer yapmaktadır. Non-toksik, non-alerjenik bir biyoadeziv polimer olarak kitosan; antimikrobiyal (34), hemostatik (35), antiinflamatuvar (36), antiviral (37), doku rejenerasyonunu hızlandırıcı, yara iyileştirici (38) ve immunojenik aktivite (39) gibi biyoaktif özellikleri nedeniyle ilaç ve aşıların mukozal uygulanmasında kapsamlı şekilde incelenmiştir. Ayrıca bukkal (40), nazal (41), intestinal (42) ve vajinal (43) gibi birçok mukozada ilaç geçirgenliğini arttırıcı özellik göstermiştir.

Ticari olarak kitosanın farklı saflık, molekül ağırlığı ve deasetilasyon dereceleri mevcuttur.

Kitosanın farmasötik uygulamalarda kullanılmasının önemli yararı C-2 pozisyonundaki amino grubu sayesinde kolaylıkla türevlendirilebilmesi, böylece ek fonksiyonlar sağlayan yeni bileşiklerin oluşturulabilmesine imkan sağlamasıdır. Böyle değişikliklerle kitosanın özellikleri farmasötik teknolojinin gereksinimlerine uygun hale getirilebilir.

Kitosan yapısındaki protonlanabilen primer amin grubu sayesinde katyonik bir biyopolimerdir. İyonik kitosan; ekzojen nükleik asitler gibi makromoleküllere, negatif yüklü mukozal yüzeyler ya da plazma membranlarına kolayca bağlanabilir (6). Farelere intraperitoneal uygulamayı takiben kitosan ve parçalanma ürünlerinin böbrek tarafından hızla elimine edildiği gösterilmiştir, böylelikle vücutta birikim önlenmektedir. Fizyolojik koşullarda kitosanın kitinaz veya lizozimler tarafından parçalandığı düşünülmektedir (44). Memelilerde kitin ve kitin sentaz olmamasına rağmen, insanlarda kitinaz tanımlanmıştır.

Kitosanın bukkal mukoza (16,40), vajinal mukoza (43,45,46), göz mukozası (47) gibi farklı mukozalarda penetrasyon artırıcı etkisi gösterilmiştir.

Şenel ve ark. yaptığı bir çalışmada (40) TGF- $\beta$  içeren kitosan jel formülasyonu hazırlanarak maddenin domuz oral mukozasından geçişi incelenmiş ve sonuç olarak kitosanın protein gibi büyük moleküllü bileşiklerin bukkal mukozadan permeabilitesini önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir.

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi çeşitli bakteri ve mantarlara karşı kabul edilmiş olup kitosan türü, molekül ağırlığı, deasetilasyon derecesi, bazı diğer kimyasal ve fiziksel özellikler gibi bir dizi faktör tarafından etkilenmektedir (48).

İkinci ve ark. (49), kitosanın klorheksidin içeren/içermeyen jel ve film formülasyonlarını hazırlayarak biyoadeziv özelliklerini ve periodontal patojen *Porphyromonas gingivalis*'e karşı antimikrobiyal etkisini incelemiştir. Hem biyoadeziv özelliği hem de antimikrobiyal etkisi nedeniyle kitosan bazlı dozaj şekillerinin periodontal hastalıkların lokal tedavisinde gelecek vadede sistemler olduğu gösterilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada (50) antioksidan bir amino asit olan taurin içeren ve içermeyen kitosan filmler hazırlanarak köpeklerde kemik defektleri üzerine periodontal yara iyileşmesi incelenmiştir. Taurinin antioksidan etkisinin yanı sıra inflamasyonu düzenleyici özelliği de vardır ve birlikte kullanıldığında kitosanın yara iyileştirici etkisini arttırdığı bildirilmiştir.

Ong ve ark. (35) kitosanın hemostatik özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir.

Günbeyaz ve ark. (51) tarafından yapılan bir çalışmada değişik molekül ağırlığı ve çözünürlüğe sahip kitosan tipleri kullanılarak BHV-1'in mukozal yolla taşınmasını sağlayan jel ve mikropartikül formülasyonları geliştirilmiş, adjuvan/taşıyıcı sistem olarak potansiyelleri in vitro değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, kitosan ile hazırlanan jel ve mikropartiküllerin BHV-1'e karşı mukozal immünizasyon için umut verici adjuvan/taşıyıcı sistem olduğu gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada kitosanın ağrı üzerine analjezik etkisi olduğu gösterilmiştir (52).

Fakhry ve ark. yaptığı bir çalışmada (53) değişik tipte iki kitosan kullanarak doku iskelesi hazırlamıştır. Kitosan doku iskelelerinin yumuşak ve sert doku rejenerasyonu üzerindeki davranışı incelenmiştir. Fibroblastlara nazaran osteoblastların kitosan doku iskelelerine daha iyi tutunduğu bildirilmiştir.

Boyuneğri ve ark. yaptığı çalışmada (54) periodontal rejenerasyon için hazırlanan kitosan jellerin etkisi insanlarda in vivo olarak değerlendirilmiştir. Kitosan jel tek başına, demineralize kemik matriksi ve kollajenöz membranla kombine halde uygulanmıştır. Kitosan jelin tek başına da oldukça etkili olduğu gösterilmiştir.

### **1.7.1. Kitosanın Oral Mukozal Taşıyıcı Sistemlerde Uygulamaları**

#### **1.7.1.1. Jel**

Aksungur ve ark. (55) değişik çözücüler ve değişik molekül ağırlığında kitosanlar kullanarak jel ve film formülasyonları hazırlamıştır. İn vitro ve in vivo çalışmalar, biyoadezif ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle kitosanın oral mukozit tedavisi ve antikandidal ilaçların verilmesi için mükemmel bir polimer olduğunu göstermiştir.

Rossi ve ark. (56) oral mukozitis tedavisine yönelik olarak trimetilkitosan ve metilpirolidinonkitosanı gliserofosfat ile değişik oranlarda karıştırarak ısıya duyarlı



jel formülasyonları geliştirmiştir. Oral mukozitis tedavisinde kullanılmak üzere benzidamin hidroklorür içeren trimetilkitosan/gliserofosfat karışımının umut vaat edici bir sistem olduğu sonucuna varılmıştır.

### 1.7.1.2. Film

Şenel ve ark. (57), kitosanın klorheksidin içeren/içermeyen jel ve film formülasyonlarını hazırlayarak *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivitesini ve in vitro salımını incelemiştir. En yüksek antifungal aktivite % 0.1 klorheksidin glukonat içeren % 2 konsantrasyona sahip kitosan jel ile elde edilmiştir. İn vitro salım çalışmaları klorheksidin glukonatin film formülasyonundan daha yavaş salındığını göstermiştir.

Ataç ve ark. (58) Chx içeren kitosan film formülasyonları geliştirmiş; boş kitosan film ve piyasa preparatıyla antimikrobiyal özellik açısından karşılaştırmıştır. Kitosan filmlerin antimikrobiyal ajanlar için iyi bir taşıyıcı olmasının yanı sıra kendisinin de oral iyileşmede kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Khoo ve ark. (59) hidrofilik polimerler polivinilalkol, polietilenoksit ve polivinilpirolidon ile kitosan karışımlarından film formülasyonları hazırlamış ve gingival taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirliğini değerlendirmiştir.

### 1.7.1.3. Sünger

Zhang ve ark. yaptığı bir çalışmada (60) dondurarak kurutma yöntemiyle sünger formunda kitosan/kollajen yapıları doku iskeleleri geliştirilmiş ve bu doku iskelelerine plazmit ve TGF- $\beta$ 1 kodlu adenoviral vektör yüklenmiştir. Çalışmada süngerlerin mikroskobik yapıları, poroziteleri ve PDL hücreleri için hücre uyumluluğu incelenmiştir. Çalışma sonuçları kitosan/kollajen yapıları doku iskelesi ile gerçekleştirilen TGF- $\beta$ 1 plazmit uygulamaları ile PDL hücrelerinin daha hızlı çoğaldığını, tip 1 ve tip 3 kollajen mRNA ekspresyonlarını arttırdığını göstermiştir.

Başka bir çalışmada Oktay ve ark. (61) tavşanlarda kitosan süngerin, PRP (platelet yönünden zenginleştirilmiş plazma) jelin ve bunların kombinasyonlarının kafatası defektlerindeki etkilerini incelemiştir.

Park ve ark. (62) periodontal yenilenme amacıyla dondurarak kurutma yöntemiyle PDGF-BB yüklü kitosan süngerleri geliştirmiş ve salım kinetiğini incelemiştir. Kitosan iskeleden büyüme faktör salımının 21. güne kadar devam ettiği bildirilmiştir. Ayrıca PDGF-BB yüklü kitosan süngerlerin kemik defektlerindeki rejenerasyonu arttırdığı gösterilmiştir.

#### **1.7.1.4. Mikropartiküler Sistem**

Ji-Shan Quan ve ark. (63) yaptıkları çalışmada kitosan mikrokürelerine eudragit-sistein konjuge ederek oral protein taşıyıcı bir sistem geliştirmiştir. Bu sistem pH duyarlıdır ve mukoadezif özelliklere sahiptir. Sığır serum albumini (BSA) model protein olarak kullanılmıştır. BSA'nın pH 7.4 PBS ortamında tiyollenmiş eudragit kaplı kitosan mikrokürelerinden birkaç saat boyunca salındığı ve bu mikrokürelerin mukoadezif özelliklerinin kitosan mikrokürelerinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

#### **1.7.1.5. Tablet**

İkinci ve ark. (64) değişik oranlarda kitosan ve karbomer kullanarak nikotin replasman tedavisinde kullanılmak üzere nikotin hidrojen tartarat (NHT) içeren biyoadezif tablet formülasyonları geliştirmiştir. Daha sonra bu tabletlerin salım ve biyoadezif özellikleri incelenmiştir. Artan kitosan konsantrasyonuyla NHT salımının arttığı, mukoadezyonun ise düştüğü sonucuna varılmıştır.

Giunchedi ve ark. (65) klorheksidin diasetat içeren kitosan mikrokürelerinden antifungal etkili bukkal tablet geliştirmiştir. Bu çalışmada, in vivo sonuçlarla geliştirilen tabletin ağız içi ilaç dağıtımı için kullanılabileceği gösterilmiştir.

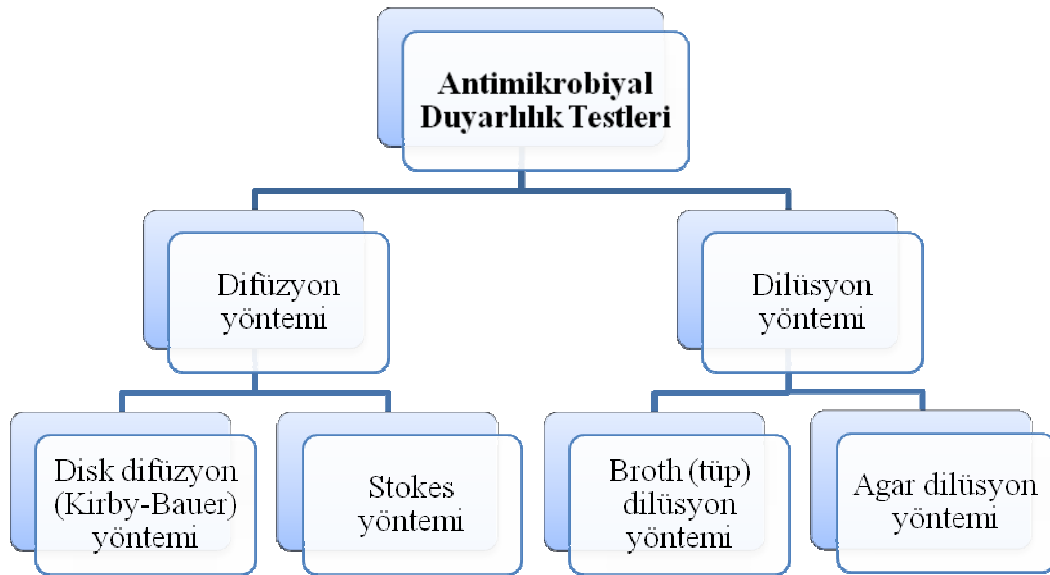
## 1.8. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal ajanın mikroorganizma üzerindeki in vitro etkinliğinin saptanması amacıyla uygulanan testlerdir.

- Kalitatif duyarlılık deneyleri (difüzyon deneyi)
- Kantitatif duyarlılık deneyleri (dilüsyon deneyi) şeklinde iki temel gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.9).

Bu yöntemlerin sonuçları,

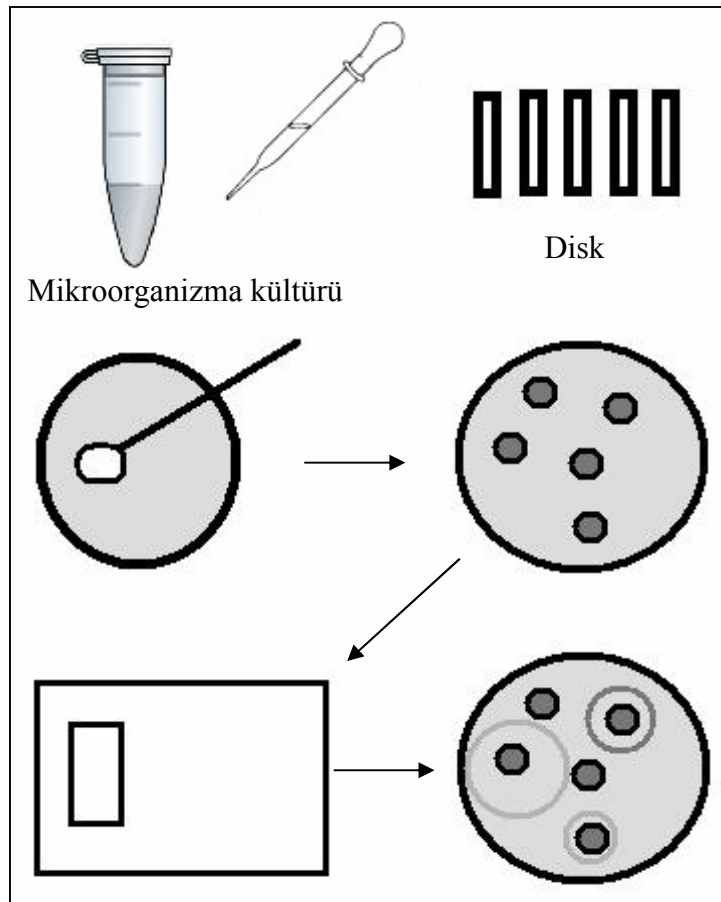
- İnhibisyon bölgesi çaplarına,
- Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) verilerine göre yorumlanır (66,67).



Şekil 1.9. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

## Difüzyon Yöntemi

Bu yöntemler katı besiyerlerinde uygulanır. En yaygın kullanılan yöntem disk difüzyon testidir. Katı besiyeri yüzeyine test mikroorganizması inoküle edildikten sonra filtre kağıdından yapılmış ve antimikrobiyal emdirilmiş diskler yerleştirilir. Mikroorganizma türüne göre değişmekle birlikte en az 24 saat etüvde inkübe edilerek antimikrobiyal maddenin agar ortamına difüze olması sonucu ortama ekilen mikroorganizma türüne karşı inhibe edici etkinliği ölçen bir testtir. Disk etrafındaki inhibisyon bölgesinin çapı mm olarak ölçülerek ilacın mikroorganizmaya etkisine ilişkin değerlendirme yapılır. Şekil 1.10'da disk difüzyon yöntemi şematize edilmiştir.



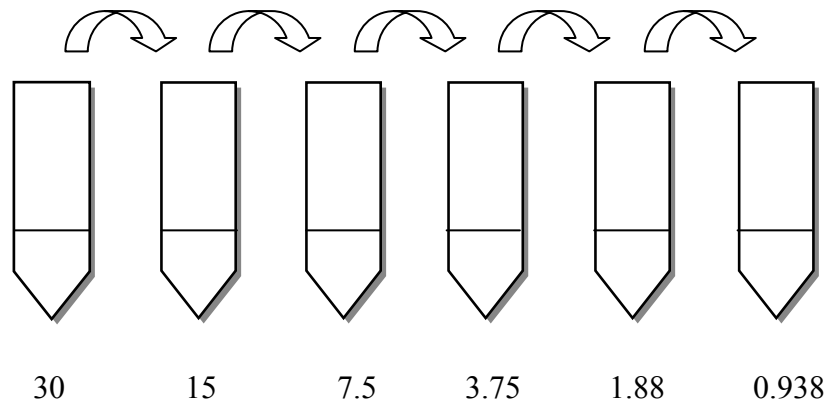
Şekil 1.10. Disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık testi

## Dilüsyon Yöntemi

Broth ve agar dilüsyon yöntemlerinde; sıvı veya katı besiyeri içinde mikroorganizma inokulumunun, iki katlı dilüsyonlar halinde değişen yoğunluklarda antimikrobiyal karşılaştırılması esastır (Şekil 1.11). İnkübasyondan sonra test mikroorganizmasının üremesini durdurmaya veya mikroorganizmayı öldürmeye yeten ilaç miktarı test sonucu olarak okunur.

MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) test mikroorganizmasının üremesini tamamen durduran ve çıplak gözle üremenin görülmediği (tüpte bulanıklığın olmadığı) en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu olarak belirlenmektedir. MBK (minimum bakterisidal konsantrasyon) test bakterisinin % 99.9'unu, MFK (minimum fungisidal konsantrasyon) ise test mantarının % 99.9'unu öldürmeye yeten antimikrobiyal miktardır. Bu değer üremenin görülmediği tüm tüplerden belirli miktarda alındıktan sonra katı agar içeren besiyeri plaklarına ekim yapıp belirli sürelerde 37 °C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra hiçbir üremenin olmadığı ilk dilüsyon tüpündeki konsantrasyon olarak belirlenir. Bakterisid/fungisid antimikrobiyaller için MİK ve MBK/MFK değerleri birbirine eşit veya yakın değerlerdir. Buna karşın bakteriyostatik/fungustatik antimikrobiyallerde MBK/MFK değeri, MİK'den çok fazladır.

Sıvı besiyerlerinde mikroorganizmalarla antimikrobiyaller doğrudan doğruya ilişkide bulduklarından sonuçlar daha duyarlıdır.



**Şekil 1.11.** Antimikrobiyal konsantrasyonunun tüpte hazırlanışı

## 2. DENEYSEL

### 2.1. Araç ve Gereçler

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril	Sigma, ABD
Colombia agar	Merck, Almanya
Colombia broth	Merck, Almanya
Cremophor EL	Sigma, ABD
Disodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Fosforik asit	Emboy, Türkiye
Hemin	Sigma, ABD
Kitosan baz, Protasan UP B 80/20	Novamatrix, Norveç
Kitosan klorür, Protasan UP CL 213	Novamatrix, Norveç
Kitosan, Chitopharm L	Cognis, Almanya
Kitosan, Chitopharm M	Cognis, Almanya
Kitosan, Chitopharm S	Cognis, Almanya
Kitosan, Chitosan medium	Sigma Aldrich, ABD
Kitosan, KiOmedine-CsU	KitoZyme, Belçika
Klorheksidin glukonat	R.N. Pharmaceuticals, Hindistan
Laktik asit	Sigma, ABD
Potasyum dihidrojen fosfat	Carlo Erba, İtalya
Sabourraud dekstroz agar (SDA)	Merck, Almanya
Sabourraud dekstroz broth (SDB)	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Riedel-de Haën, Almanya
Sodyum klorür	Riedel-de Haën, Almanya
Triamsinolon asetonit	Farmabios, İtalya
Vitamin K	Sigma, ABD

### 2.1.2. Kullanılan Aletler

Boş disk CE	Bioanalyse, Türkiye
Chiba biyopsi iğnesi	Matek medikal, Türkiye
ELISA okuyucusu	BioTek, ABD
Franz difüzyon hücresi	İldam, Türkiye
HPLC sistemi	Waters, ABD
Koni-plak viskozimetre	Brookfield DV-II+, ABD
Otomatik anaerob kabin	Electrotek, İngiltere
pH bandı	Merck, Almanya
Selüloz selofan zar (MWCO 12-14000)	Thomas Scientific, ABD
TA-XT plus tekstür analiz aleti	Stable Micro Systems, İngiltere
UV spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Zeta potansiyel ölçüm cihazı (Nano-ZS)	Malvern, İngiltere

## 2.2. Yöntemler ve Deneyler

### 2.2.1. Etkin Maddeye Ait Çalışmalar

#### 2.2.1.1. UV Spektrumu

Triamsinolon asetonitin mobil faz içinde hazırlanan  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltisinin 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınmış ve çözeltinin gösterdiği  $\lambda_{\text{max}}$  değeri tespit edilmiştir.

#### 2.2.1.2. TAC'ın Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Triamsinolon asetonitin salım ortamından tayini için ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem tanımlanmıştır. Ters faz kolonu (Fortis C18,  $3\mu\text{m}$  partikül boyutu,  $4.6 \times 150$  mm) asetonitril:su (50:50, h/h) içeren hareketli faz ile elue edilmiştir. Hareketli faz akış hızı  $0.6 \text{ mL.dk}^{-1}$  ve fotodiyot array dedektör dalga boyu  $240 \text{ nm}$ 'dir.

TAC'ın miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Tablo 2.1'de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** TAC'ın HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar

Kolon	Fortis C18 ( $3\mu\text{m}$ partikül boyutu, $4.6 \times 150$ mm)
Mobil faz	Asetonitril : Su (50:50)
Enjeksiyon hacmi	$10 \mu\text{L}$
Akış hızı	$0.6 \text{ mL.dk}^{-1}$ / izokratik akış
Dedektör	Waters 2996 UV dedektör
Dalga boyu	$240 \text{ nm}$
Sıcaklık	$25 \text{ }^\circ\text{C}$

TAC'ın kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi için, etkin maddenin asetonitril içinde  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış ve 5, 10, 15, 20, 30 ve  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda TAC olacak şekilde mobil faz ile seyreltmeler yapılarak 6 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.



### 2.2.1.3. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan prosedürdür. Metot validasyonu, kullanılan analitik yöntemin güvenilirliğinin teminatıdır.

ICH'e göre miktar tayini için validasyon karakteristikleri;

- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
- Stabilité
- Özgünlük'tür.

#### 2.2.1.3.1 Doğrusallık

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirlenen konsantrasyon aralığında analit konsantrasyonu ile doğru orantılı cevap vermesidir. Bu amaçla etkin maddenin asetonitril içinde  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış ve her birinde 5, 10, 15, 20, 30 ve  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda TAC olacak şekilde mobil faz ile seyreltmeler yapılarak 6 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı pik alanları kullanılarak elde edilmiştir.

#### 2.2.1.3.2. Doğruluk

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığıdır. TAC'ın miktar tayini için kullanılan yöntemin gün içi ve günler arası doğruluğu değerlendirilmiştir. Doğruluk, eklenen madde miktarları ile bulunan madde miktarları karşılaştırılarak BH (bağıl hata) değerlerinin hesaplanması ile değerlendirilmiştir.

Gün içi çalışmalarda, doğrusallık aralığına giren 3 farklı konsantrasyon seviyesinde (düşük, orta, yüksek; 5, 20, 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), her bir konsantrasyondan 3 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içerisinde arka arkaya analiz edilmiştir.

Günler arası çalışmalar, gün içi çalışmaların 6 farklı günde yenilenmesi ile yapılmıştır. Doğrusallık aralığına giren 3 farklı konsantrasyon seviyesinde (düşük, orta, yüksek; 5, 20, 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), her bir konsantrasyondan 3 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden 6 gün analiz edilmiştir.

#### **2.2.1.3.3. Kesinlik**

Kesinlik, bir analitik yöntemin tekrar edilebilirlik derecesinin ölçülmesidir. Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik, yalnız tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerlerle ilgisi yoktur. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı derişimde örnek ardı ardına ölçülerek, örnekler için varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak ifade edilir.

##### **2.2.1.3.3.1. Tekrar Edilebilirlik**

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır. Tekrar edilebilirliğin tespiti için, doğrusallık aralığına giren 3 farklı konsantrasyon seviyesinde (düşük, orta, yüksek; 5, 20, 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile 6 kez ayrı ayrı okutulup, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için VK değerleri hesaplanmıştır.

##### **2.2.1.3.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik**

Aynı konsantrasyondaki çözeltiden hareketle, aynı laboratuvar, aynı analist ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenir. Üç farklı derişim düzeyinde uygun sayıda bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün ve farklı günlerde yapılır.

Gün içi tekrar elde edilebilirliğin tespiti için doğrusallık aralığına giren 3 farklı konsantrasyon seviyesinde (düşük, orta, yüksek; 5, 20, 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) her bir konsantrasyondan 3 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içerisinde arka arkaya analiz edilmiştir.

Günler arası tekrar elde edilebilirliğin tespiti için doğrusallık aralığına giren 3 farklı konsantrasyon seviyesinde (düşük, orta, yüksek; 5, 20, 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) her bir konsantrasyondan 3 adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden 6 gün analiz edilmiştir.

Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen derişimler için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır.

#### **2.2.1.3.4. Stabilite**

TAC'ın deney süresince stabil kaldığının gösterilmesi amacıyla 5, 20, 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış, örnekler hemen, oda sıcaklığında-karanlıkta bekletildikten 12, 24 ve 36 saat sonra analiz edilmiştir.

#### **2.2.1.3.5. Özgünlük**

Bir analitik yöntemin sadece amaçlanan bileşenleri tayin edebilme yeteneği olup, sayısal değeri yoktur. Bunun için, in vitro salım çalışmalarında etkin madde içeren jelle uygulanan işlemler boş jelle de uygulanarak HPLC kromatogramı elde edilmiş ve TAC içeren jelle ait kromatogram ile karşılaştırılarak özgünlük gösterilmiştir.

#### **2.2.2. Formülasyon Geliştirme**

Molekül ağırlığı, çözünürlük, elde edildiği kaynak açısından farklı özelliklere sahip, farklı tipte kitosanlar kullanılarak jel formülasyonları geliştirilmiştir. Çözücü olarak distile su veya % 1 (h/h) laktik asit çözeltisi kullanılmıştır. Triamsinolon asetonit, hazırlanan jelle % 0.1 (a/h) konsantrasyonda disperse edilmiştir (Tablo 2.3, Şekil 2.1).

**Tablo 2.2.** Formülasyonlarda kullanılan kitosanlar

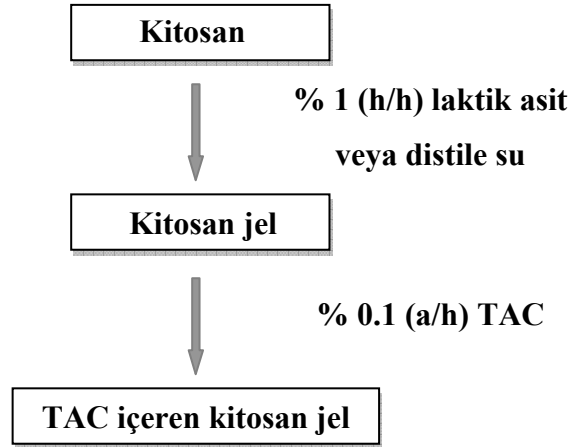
<b>Kitosan tipi</b>	<b>Çözücü</b>	<b>MA (kDa) *</b>	<b>DD (%) **</b>
Chitopharm S (Cognis, Almanya) <i>Hayvansal kaynaklı</i>	% 1 (h/h) laktik asit çözeltisi	50-1000	> 70
Chitopharm M (Cognis, Almanya) <i>Hayvansal kaynaklı</i>		300- 2000	> 70
Chitopharm L (Cognis, Almanya) <i>Hayvansal kaynaklı</i>		500-5000	> 70
Chitosan medium (Sigma Aldrich, ABD) <i>Hayvansal kaynaklı</i>		190-310	75-85
KiOmedine-CsU (KitoZyme, Belçika) <i>Bitkisel(mantar) kaynaklı</i>		50	72.6
Protasan UP CL 213 (Novamatrix, Norveç) <i>Hayvansal kaynaklı</i>	Distile su	150-400	> 75-90
Protasan UP B 80/20 (Novamatrix, Norveç) <i>Hayvansal kaynaklı</i>	% 1 (h/h) laktik asit çözeltisi	125-400	80-89

\* Molekül ağırlığı, \*\* Deasetilasyon derecesi

**Tablo 2.3.** Geliştirilen jel formülasyonları

<b>Formülasyon kodu</b>		<b>Kitosan konsantrasyonu (%) a/h</b>	<b>Çözücü</b>	<b>Kitosan tipi</b>
<b>Boş</b>	<b>Etkin madde içeren*</b>			
S	S 01	3	% 1 (h/h) laktik asit çözeltisi	Chitopharm S
M	M 01	2		Chitopharm M
L	L 01	1		Chitopharm L
Sig	Sig 01	2		Chitosan medium
K	K 01	5		KiOmedine-CsU
P	P 01	3	Distile su	Protasan UP CL 213
P-B	P-B 01	3	% 1 (h/h) laktik asit çözeltisi	Protasan UP B 80/20

\* Tüm formülasyonlarda etkin madde içeriği % 0.1 a/h'dir.



Şekil 2.1. Kitosan jel formülasyonlarının hazırlanması

### 2.2.2.1. Jellerin Karakterizasyonu

#### pH Ölçümü

Hazırlanan jel formülasyonlarının pH değerleri pH-indikatör bantları kullanılarak ölçülmüştür.

#### Viskozite Ölçümü

Hazırlanan jel formülasyonlarının viskozite ölçümleri Brookfield koni plak viskozimetresinde CP52 kodlu koni kullanılarak  $25 \pm 0.1$  °C’de, 0.5-100 rpm arasında gerçekleştirilmiştir.

#### Zeta Potansiyel Ölçümü

Hazırlanan jel formülasyonlarının zeta potansiyel ölçümleri zeta potansiyel analiz cihazı Zetasizer Nano ZS ile yapılmıştır. Ölçümden önce jeller distile su ile 1:5 oranında seyreltilmiştir.

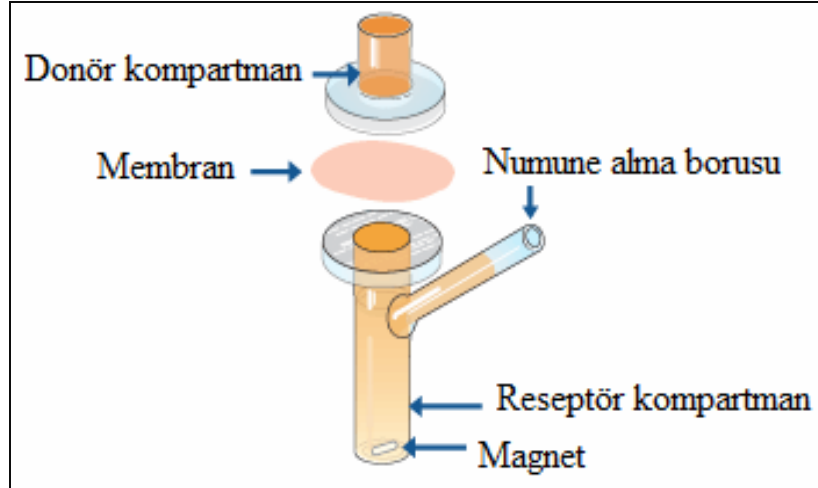
### 2.2.3. İn Vitro Çalışmalar

#### 2.2.3.1. Etkin Madde Salımı

Orta molekül ağırlıklı kitosan jel (M 01) ile yapılan ön çalışmalarda etkin madde salımında difüzyon hücresi ve Franz difüzyon hücresi kullanılmıştır. Maddenin çözünürlüğü düşük olduğu için salım ortamına yüzey etkin madde eklenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla sodyum lauril sülfat (SLS) ve Cremophor EL denenerek salım ortamında yer alan yüzey etkin maddenin etkisi test edilmiş, sonrasında da kullanılacak yöntemle karar verilmiştir.

Jellerden in vitro etkin madde salım çalışmaları 2.01 cm<sup>2</sup> difüzyon alanına ve 20 mL reseptör hacmine sahip Franz difüzyon hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2). Difüzyon hücreleri, sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış olan su banyosu içinde manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir (57). Difüzyon ortamı olarak pH:7.4 fosfat-tuz tamponu (68) reseptör kısma eklenmiştir. Daha küçük hacimlerde sink koşulu sağlanabilmesi ve etkin maddenin çözünürlüğünün artırılabilmesi için salım ortamına % 1 (h/h) yüzey etkin madde eklenmiştir. Önceden distile su ile hidrate edilmiş selofan zar (cut-off değeri 12-14000) hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde reseptör bölmenin açık olan üst kısmına yerleştirilmiş ve donör bölme ile sıkıştırılmıştır. Donör bölmeye jel konulduktan sonra formülasyonların buharlaşmasını önlemek için üst kısmı parafilm ile kapatılmıştır. Örnek alma koluna 20 cm uzunluğunda chiba iğnesi yerleştirilmiştir. 30, 60, 120, 180, 240, 300 ve 360. dakikalarda 1 mL örnekler alınmış ve yerine aynı hacimde difüzyon ortamı eklenmiştir. Alınan numuneler 0.45 µm'lik filtreden süzöldükten sonra HPLC yöntemi kullanılarak etkin madde içeriği tayin edilmiştir.

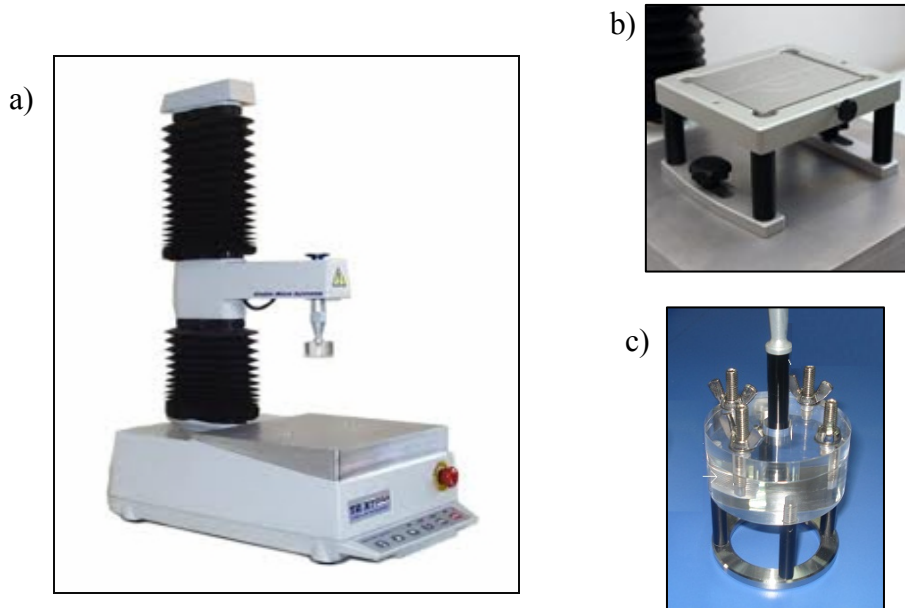
Formülasyonlardan etkin madde salımının incelenmesinde salım ortamına eklemek üzere yüzey etkin madde olarak % 1 (h/h) Cremophor EL daha iyi sonuç verdiği için çalışmalara bu yüzey etkin madde ile devam edilmiştir.



Şekil 2.2. Franz difüzyon hücresi

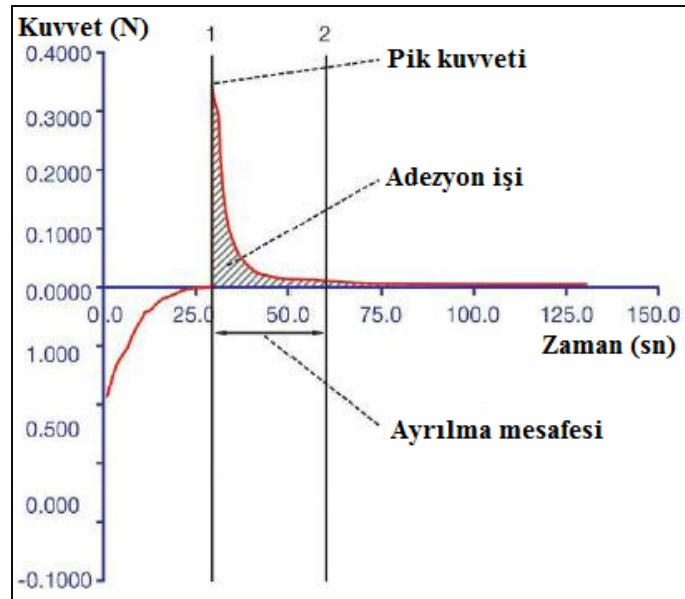
#### 2.2.4. Mukoadezyon Çalışmaları

Tablo 2.3'te verilen formülasyonların mukoadezyon ölçümleri TA-XT Plus model tekstür analiz aletinde (Stable Micro Systems) yapılmıştır (Şekil 2.3). Ayrıca molekül ağırlığının mukoadezyon üzerine etkisini incelemek amacıyla farklı molekül ağırlığına sahip baz kitosanlardan hareketle % 2 konsantrasyonda düşük molekül ağırlıklı (% 2 S), orta molekül ağırlıklı (% 2 M) ve yüksek molekül ağırlıklı (% 2 L) boş jeller hazırlanmıştır.



Şekil 2.3. a) TA-XT Plus tekstür analiz aleti, b) platform ve c) rig

Mukoadezyon çalışmaları kasaptan kesimden hemen sonra alınan taze sığır yanak mukozası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Epitel doku bağ dokusundan bisturi yardımıyla ayrılmıştır. Mukozalardan ortalama 4 mm kalınlığında kesit alınarak deneye uygun hale getirilmiş ve platforma yerleştirilmiştir. Mukoza ile probun temas ettiği yüzey alanı  $0.785 \text{ cm}^2$ ; kullanılan jel miktarı ise  $0.3 \text{ mL}$ 'dir. Aletin probu  $0.1 \text{ mm/sn}$  hızla jel yüzeyine değdirilmiş, jel ile mukoza üç farklı süre boyunca (60, 120 ve 180 sn)  $0.2 \text{ N}$  kuvvet uygulanarak temas halinde bekletilmiştir. Daha sonra probun  $0.1 \text{ mm/sn}$  hızla jel yüzeyinden uzaklaşması sağlanarak iki yüzeyi birbirinden ayırmak için gereken kuvvet ölçülmüştür. Burada dozaj formunu ayırmak için gereken kuvvet, kuvvet-zaman grafiğinde eğri altındaki alan yardımıyla hesaplanmaktadır (Şekil 2.4). Her bir formülasyon için test 3 kez tekrarlanmıştır.



**Şekil 2.4.** Tekstür analiz aleti ile elde edilen kuvvet-zaman eğrisi

TA-XT Plus model tekstür analiz aleti kullanılarak elde edilen kuvvet (N)-zaman (sn) eğrileri altında kalan alan adezyon işini vermektedir. Adezyon işi verilerinin temas alanına bölünmesiyle de mukoadezyon işi elde edilmektedir. Adezyon/mukoadezyon işi verileri formülasyonun biyo/mukoadezif özelliği



hakkında bilgi vermektedir. Mukoadezyon kuvveti, iki yüzeyi ayırmak için gerekli olan maksimum kuvveti ifade etmektedir.

Etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonların ikili karşılaştırmalarında aralarında fark olup olmadığını test etmek için “Mann-Whitney U”; çoklu karşılaştırmalarda ise “Kruskal Wallis” testi kullanılmıştır. Temas süresinin adezyon işi üzerine etkisini test etmek içinse “Friedman” testi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

### 2.2.5. Mikrobiyolojik Çalışmalar

Bu çalışmada, ağız ortamında özellikle kronik inflamatuvar periodontal/ mukozal lezyonlara sebep olabilen, HIV hastalarında sıklıkla görülen (69) bakterilerden olan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC#29523), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC#33277) suşları ve bir maya benzeri mantar türü olan, HIV hastalarında mukozal fungal lezyonlara sebep olabilen, HIV ile enfekte kişilerde % 95 oranında görülen (70) *Candida albicans* (ATCC#10231) standart suşu ile ağızdan konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ile izole edilen *Candida albicans* ağız suşu kullanılarak kitosan jellerin antimikrobiyal etkisi disk difüzyon ve broth makrodilüsyon metodu ile değerlendirilmiştir. İzole *Candida* ağız suşu, ağız içinden bukkal eküvyonla mukozadan sürüntü kültürü şeklinde alınan örnekten geçerli tanımlama testleri kullanılarak izole edilmiştir (Öğr. Gör. Gülçin Akca, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden sağlanmıştır). *Candida* standart suşu ile ağızdan izole edilen bireye ait suşun arasında farklılıklar gözlenebilmektedir. *Candidalar* kişiden kişiye, ağız ortamındaki ekolojik bölgelere göre de değişebilmektedir; bu türler dimorfik mantar türlerinden biri olduğu için ortam koşullarına göre değişik davranış sergileyebilmektedir.

#### a) Mikroorganizmaların üretilmesi

Standart *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* suşları; Vit K (1 µg/mL), hemin (5 µg/mL) ve % 5 koyun kanı ilave edilmiş Colombia agar (Merck, Almanya) besiyeri içeren petri plaklarında 37 °C’de 4-5 gün süreyle otomatik anaerob kabin (Electrotek, İngiltere) içerisinde % 10 CO<sub>2</sub>, % 10 H<sub>2</sub>, % 80 N<sub>2</sub> atmosfer ortamında

inkübe edilmiştir. *C. albicans* suşları ise Sabourraud dekstroz agar (SDA) (Merck, Almanya) besiyeri içeren petri plaklarında 35 °C'de 48 saat aerobik koşullarda inkübe edilmiştir.

### **b) Disk difüzyon yöntemi**

Kitosan jel formülasyonlarının bakteri ve mantarlara karşı in vitro antimikrobiyal aktivitesi öncelikle disk difüzyon metoduyla değerlendirilmiştir. Bu yöntem için bakteri süspansiyonları  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL (colony forming unit/mililitre) konsantrasyonda 0.5 McFarland bulanıklık ölçüsü standardı esas alınarak, mantar süspansiyonları ise 2 McFarland bulanıklık ölçüsü standardı esas alınarak turbidometrik olarak hazırlanmıştır ve ELISA okuyucusunda (BioTek, ABD) spektrofotometrik olarak optik dansiteleri ölçülmüştür. Daha önce belirtilen besiyerlerini içeren plaklar üzerine mikroorganizma süspansiyonlarından ekim yapılmıştır. Bekleme yapılmadan besiyerleri üzerine boş diskler (boş disk CE, Bionalayse, Türkiye, lot no:110401) birbirlerinden belirli uzaklıklarda yerleştirilmiş ve disklerin üzerine jel formülasyonlardan 20 µL konulmuştur. Daha sonra plaklar *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* için, Vit K (1 µg/mL), hemin (5 µg/mL) ve % 5 koyun kanı ilave edilmiş Colombia agar (Merck, Almanya) besiyeri içeren petri plaklarında 37 °C'de 4-5 gün süreyle otomatik anaerob kabin (Electrotek, İngiltere) içerisinde % 10 CO<sub>2</sub>, % 10 H<sub>2</sub>, % 80 N<sub>2</sub> atmosfer ortamında inkübe edilmiştir. *C. albicans* suşları ise Sabourraud dekstroz agar (SDA) (Merck, Almanya) besiyeri içeren petri plaklarında 35 °C'de 48 saat aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, antimikrobiyal aktivite için inhibisyon bölgelerinin çapları ölçülmüştür. Kontrol olarak % 0.1 ve 0.2'lik klorheksidin çözeltileri de aynı şekilde diskler üzerine konularak belirtilen koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

### **c) Broth makrodilüsyon yöntemi**

Kitosan jellerin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) ve minimum fungusidal konsantrasyonu (MFK) broth makrodilüsyon metodu ile değerlendirilmiştir.

Broth makrodilüsyon yöntemi için bir seri steril ağzı kapaklı cam tüpler hazırlanmış ve bu tüplere 1 mL miktarda her iki bakteri için aynı ek maddeler ilave edilmiş Colombia broth (Merck, Almanya), *Candida* türleri için ise Sabourraud dekstroz broth (SDB) (Merck, Almanya) sıvı besiyeri ilave edilmiştir. Üzerlerine belirli konsantrasyonlarda hazırlanmış jel formülasyonlardan ilk tüpte başlangıç konsantrasyonları olacak şekilde 1 mL ilave edilmiştir. Daha sonra tüplerdeki jel konsantrasyonlarının ½ sulandırılmaları yapılmıştır. Seri sulandırılmalar hazırlandığında üzerlerine test mikroorganizma solüsyonlarından 100 µL eklenerek tüpler daha önce belirtilen üretilme koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda görünür üremenin olmadığı ilk tüpteki jel konsantrasyonu MİK değerini vermektedir. Daha sonra üremenin olmadığı tüm tüplerden mikroorganizmaların üretilmesinde kullanılan agar içeren besiyerlerine ekim yapılarak aynı koşullarda üretilmiştir. Hiçbir üremenin görülmediği en yüksek jel konsantrasyonu MBK/MFK değerleri olarak tanımlanmıştır. Kontrol olarak % 0.1 ve 0.2'lik klorheksidin glukonat çözeltileri de aynı şekilde tüm mikroorganizmalar için broth makrodilüsyon testine tabi tutulmuştur. Her iki yöntem de iki kez tekrarlanmış, verilerin ortalaması alınarak kaydedilmiştir.

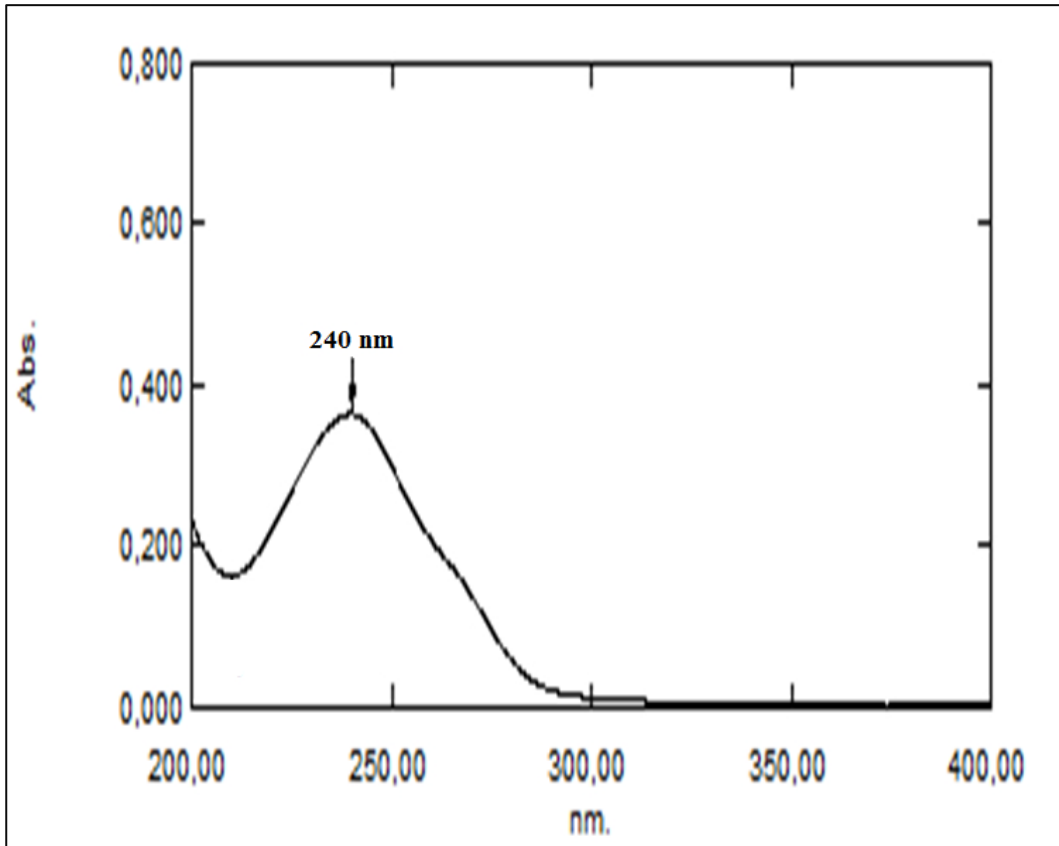
Çalışmada kullanılan klorheksidin glukonat katyonik biguaniddir. Vejetatif bakterilere karşı güçlü, mantarlara ve virüslere orta derecede etkindir. Katyonik özelliğinden dolayı oral mukozaya güçlü şekilde yapışır. Oral kandidiyazis tedavisinde etkinliği saptanan klorheksidin, geniş spektrumlu etkisiyle *C. albicans* üzerinde de antifungal etki sağlar. Kandidiyal mikroorganizmaların oral yüzeylere yapışmasını engelleyerek tedaviye katkıda bulunur (71).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Etkin Maddeye Ait Çalışmalar

##### 3.1.1. UV Spektrumu

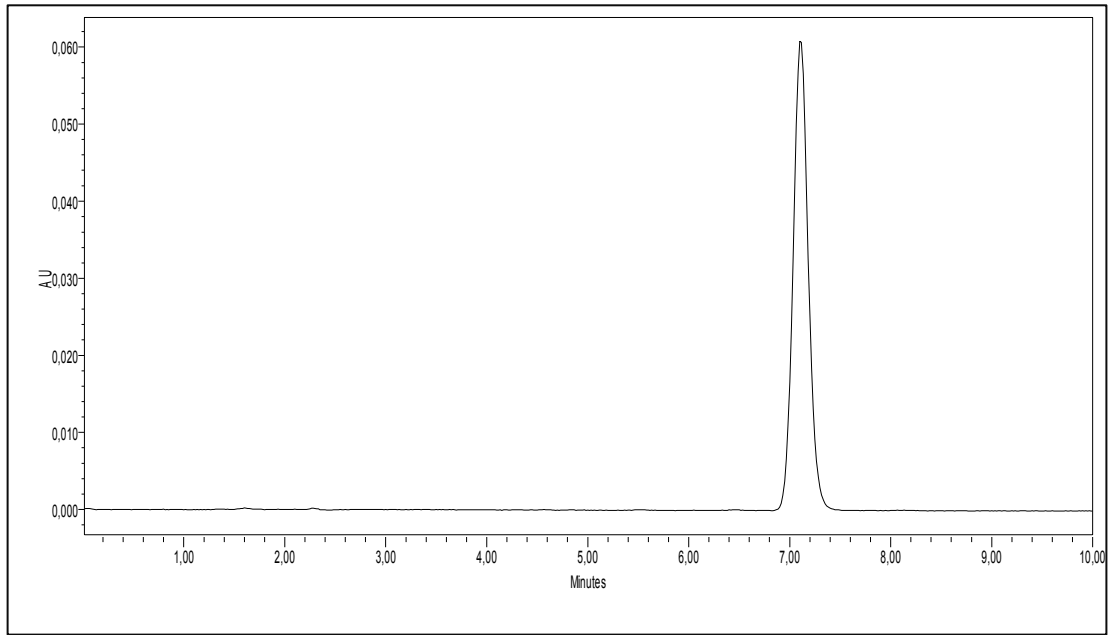
TAC'ın mobil faz içinde  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanmış çözeltilisinin 200-400 nm arasındaki UV spektrumu Şekil 3.1'de verilmiştir. Bu UV spektrumuna göre, analitik yöntemin validasyonunda maksimum absorbansın gözlemlendiği dalga boyu olan 240 nm seçilmiştir.



Şekil 3.1. TAC'ın mobil faz içindeki UV spektrumu

### 3.1.2. TAC'ın Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

TAC'ın HPLC ile in vitro miktar tayini Bölüm 2.2.1.2'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiş olup TAC'a ait örnek kromatogram Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi, TAC'a ait pik düzgün bir şekilde elde edilmiş ve alıkonma zamanı 7.1 dak olarak bulunmuştur.



Şekil 3.2. TAC'a ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ait HPLC kromatogramı

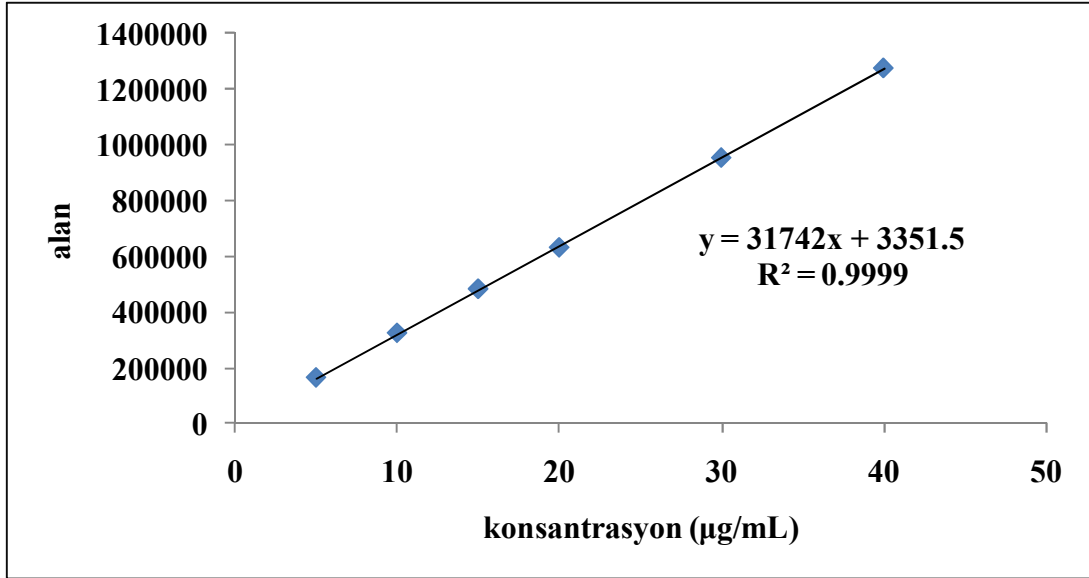
#### 3.1.2.1. Analitik Yöntemin Validasyonu

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları için doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, stabilite ve özgünlük değerlendirilmiştir.

##### 3.1.2.1.1. Doğrusallık

TAC'ın asetonitrilde  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltisinden hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda  $5-40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerde miktar tayini sonunda elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 3.3'te verilmiştir. Tanımlayıcılık katsayısı  $r^2$

= 0.9999 olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir. Regresyon katsayısı değerinin 1'e çok yakın çıkması, TAC kalibrasyon doğrusunun doğrusallığının göstergesidir.



Şekil 3.3. TAC'nin kalibrasyon doğrusu (n=6)

### 3.1.2.1.2. Doğruluk

TAC'nin asetonitrilde  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltilisinden hareketle 5, 20 ve  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin analiz sonucu bulunan değerler kalibrasyon doğrusunda yerine konarak konsantrasyon ve % bağıl hata hesaplanmıştır. Tablo 3.1'de elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Bağıl hata değerleri % 2.5'in altında bulunmuştur.

**Tablo 3.1.** Gün içi ve günler arası doğruluk (n=6)

	<b>Eklenen kons.</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>Bulunan kons.</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>SS*</b>	<b>Bağıl hata (%)</b>
<b>Gün içi</b>	5	5.05	0.0515	0.940
	20	20.0	0.0788	-0.217
	40	40.1	0.0166	0.268
<b>Günler arası</b>	5	5.12	0.112	2.48
	20	20.0	0.222	0.0488
	40	40.1	0.279	0.368

\* Standart Sapma

**3.1.2.1.3. Kesinlik****3.1.2.1.3.1. Tekrar Edilebilirlik**

TAC'ın asetonitrilde  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltilisinden hareketle 5, 20 ve  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonlarda hazırlanan örnekler ile elde edilen bulgular Tablo 3.2'de verilmiştir. Varyasyon katsayısı değerleri % 1'in altında bulunmuştur.

**Tablo 3.2.** Tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)

	<b>Konsantrasyon (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>X <math>\pm</math> SS</b>	<b>VK (%)</b>
<b>5 <math>\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}</math></b>	5.46	5.45 $\pm$ 0.0227	0.416
	5.46		
	5.45		
	5.47		
	5.44		
	5.41		
<b>20 <math>\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}</math></b>	19.7	19.7 $\pm$ 0.0529	0.269
	19.7		
	19.6		
	19.6		
	19.7		
	19.8		
<b>40 <math>\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}</math></b>	40.2	40.0 $\pm$ 0.136	0.340
	40.1		
	39.9		
	40.1		
	40.1		
	39.9		

**3.1.2.1.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik**

TAC'ın asetonitrilde 100  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltilisinden hareketle 5, 20 ve 40  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  konsantrasyonlarda hazırlanan örnekler ile elde edilen bulgular Tablo 3.3'te verilmiştir. Varyasyon katsayıları % 2.5'in altında bulunmuştur.



**Tablo 3.3.** Gün içi ve günler arası kesinlik (n=6)

	<b>Eklenen kons.</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>Bulunan kons.</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>SS</b>	<b>VK (%)</b>
<b>Gün içi</b>	5	5.05	0.0515	1.02
	20	20.0	0.0788	0.395
	40	40.1	0.0166	0.0414
<b>Günler arası</b>	5	5.12	0.112	2.24
	20	20.0	0.222	1.11
	40	40.1	0.279	0.698

**3.1.2.1.4. Stabilité**

TAC'ın deney süresince stabil kaldığının gösterilmesi amacıyla hazırlanan 5, 20 ve 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  konsantrasyondaki çözeltiler hemen, 12, 24 ve 36 saat sonra analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

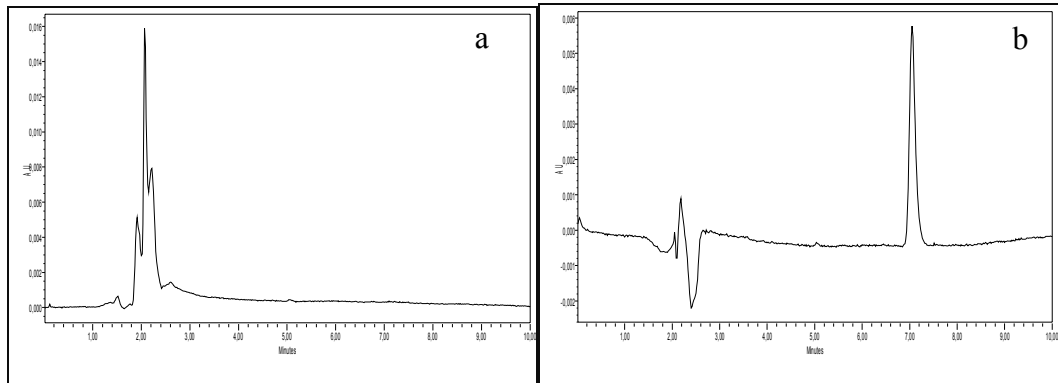
**Tablo 3.4.** Analitik yöntemin validasyonunda TAC'a ait stabilite sonuçları (n=6)

<b>Ölçüm zamanı (saat)</b>	<b>Eklenen kons. (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Bulunan kons. (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>SS</b>	<b>Geri kazanım (%)</b>	<b>VK (%)</b>
0	5	5.27	0.0832	105	1.58
12	5	5.29	0.0771	106	1.46
24	5	5.28	0.0879	106	1.66
36	5	5.29	0.0926	106	1.75
0	20	19.8	0.470	99.2	2.37
12	20	19.9	0.506	99.7	2.54
24	20	19.9	0.524	99.7	2.63
36	20	20.0	0.501	99.9	2.50
0	40	39.8	0.264	99.5	0.662
12	40	39.9	0.235	99.7	0.590
24	40	39.9	0.249	99.7	0.624
36	40	40.0	0.219	99.9	0.548

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin hazırlandığı an ve hazırlandıktan 12, 24, 36 saat sonra ölçülen konsantrasyonları karşılaştırıldığında değişiklik olmadığı görülmüştür, varyasyon katsayıları % 3'ün altında bulunmuştur. Herhangi bir bozunma ürününe ait pike rastlanmamıştır.

### 3.1.2.1.5. Özgünlük

Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin ve salım ortamındaki maddelerin etkin madde ile aynı kromatografik şartlarda pik verip vermediğinin belirlenmesi amacıyla in vitro salım çalışmalarında etkin madde içeren jelle uygulanan işlemler boş jelle de uygulanarak HPLC kromatogramı elde edilmiştir. Şekil 3.4'de boş ve etkin madde içeren formülasyondan salım çalışmasından elde edilen pikler verilmiştir. Elde edilen kromatogramda TAC ile aynı alıkonma zamanına sahip madde tespit edilmemiştir. Buna göre yöntemin TAC'ın kitosan jelden tayini için özgün bir yöntem olduğu gösterilmiştir.



**Şekil 3.4.** a) Boş ve b) etkin madde içeren jelden in vitro salım çalışması sırasında elde edilen HPLC kromatogramları

### 3.1.3. Formülasyon Geliştirme

#### Organoleptik Kontroller

Jel formülasyonlarının organoleptik özellikleri Tablo 3.5'te verilmiştir.

**Tablo 3.5.** Jellerin organoleptik özellikleri

Formülasyon kodu	Renk	Koku	Formülasyon kodu	Renk	Koku
<b>S</b>	renksiz	kokusuz	<b>S 01</b>	beyazımsı	kokusuz
<b>M</b>	renksiz	kokusuz	<b>M 01</b>	beyazımsı	kokusuz
<b>L</b>	renksiz	kokusuz	<b>L 01</b>	beyazımsı	kokusuz
<b>Sig</b>	renksiz	kokusuz	<b>Sig 01</b>	beyazımsı	kokusuz
<b>K</b>	sarı	bitkisel kokulu	<b>K 01</b>	sarı/krem	bitkisel kokulu
<b>P</b>	renksiz	kokusuz	<b>P 01</b>	beyazımsı	kokusuz
<b>P-B</b>	renksiz	kokusuz	<b>P-B 01</b>	beyazımsı	kokusuz

Baz kitosan/suda çözünen protasan klorürle hazırlanan jeller renksiz ve kokusuz iken, mantar kaynaklı kitosan (K) sarı renkte ve bitkisel kokuludur.

#### **pH ve Zeta Potansiyel**

Hazırlanan jel formülasyonların pH ve zeta ( $\zeta$ ) potansiyel değerleri Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 3.6.** Jellerin pH ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyon kodu	pH	$\zeta$ potansiyel (mV) $\pm$ SS	Formülasyon kodu	pH	$\zeta$ potansiyel (mV) $\pm$ SS
<b>S</b>	5	68.4 $\pm$ 0.86	<b>S 01</b>	4-5	72.6 $\pm$ 1.41
<b>M</b>	4	82.9 $\pm$ 2.22	<b>M 01</b>	3-4	88.3 $\pm$ 1.22
<b>L</b>	3	97.6 $\pm$ 2.92	<b>L 01</b>	2-3	96.2 $\pm$ 3.33
<b>Sig</b>	4	88.0 $\pm$ 2.91	<b>Sig 01</b>	3-4	94.3 $\pm$ 3.17
<b>K</b>	5-6	41.5 $\pm$ 0.78	<b>K 01</b>	5	44.2 $\pm$ 1.37
<b>P</b>	4-5	87.4 $\pm$ 3.25	<b>P 01</b>	4	85.3 $\pm$ 2.80
<b>P-B</b>	5	66.3 $\pm$ 1.46	<b>P-B 01</b>	4-5	68.0 $\pm$ 2.31

Bütün jel formülasyonları için pozitif zeta potansiyel değerleri elde edilmiştir, yani katyonik yapıdadırlar. Düşük molekül ağırlıklı (S), orta molekül ağırlıklı baz kitosan (M/Sig) ve mantar kaynaklı kitosan (K) formülasyonlarında ortama TAC ilavesiyle zeta potansiyel değerlerinde artış gözlenirken yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan (L), suda çözünen protasan klorür (P) ve baz protasan (P-B) formülasyonları için belirgin fark gözlenmemiştir.

Etkin madde ilavesi formülasyonların pH değerlerinde hafif bir düşüşe neden olmuştur.

### Viskozite

Hazırlanan jel formülasyonların 10 rpm'deki (kayma hızı 20 sn<sup>-1</sup>) viskozite değerleri Tablo 3.7'de gösterilmiştir.

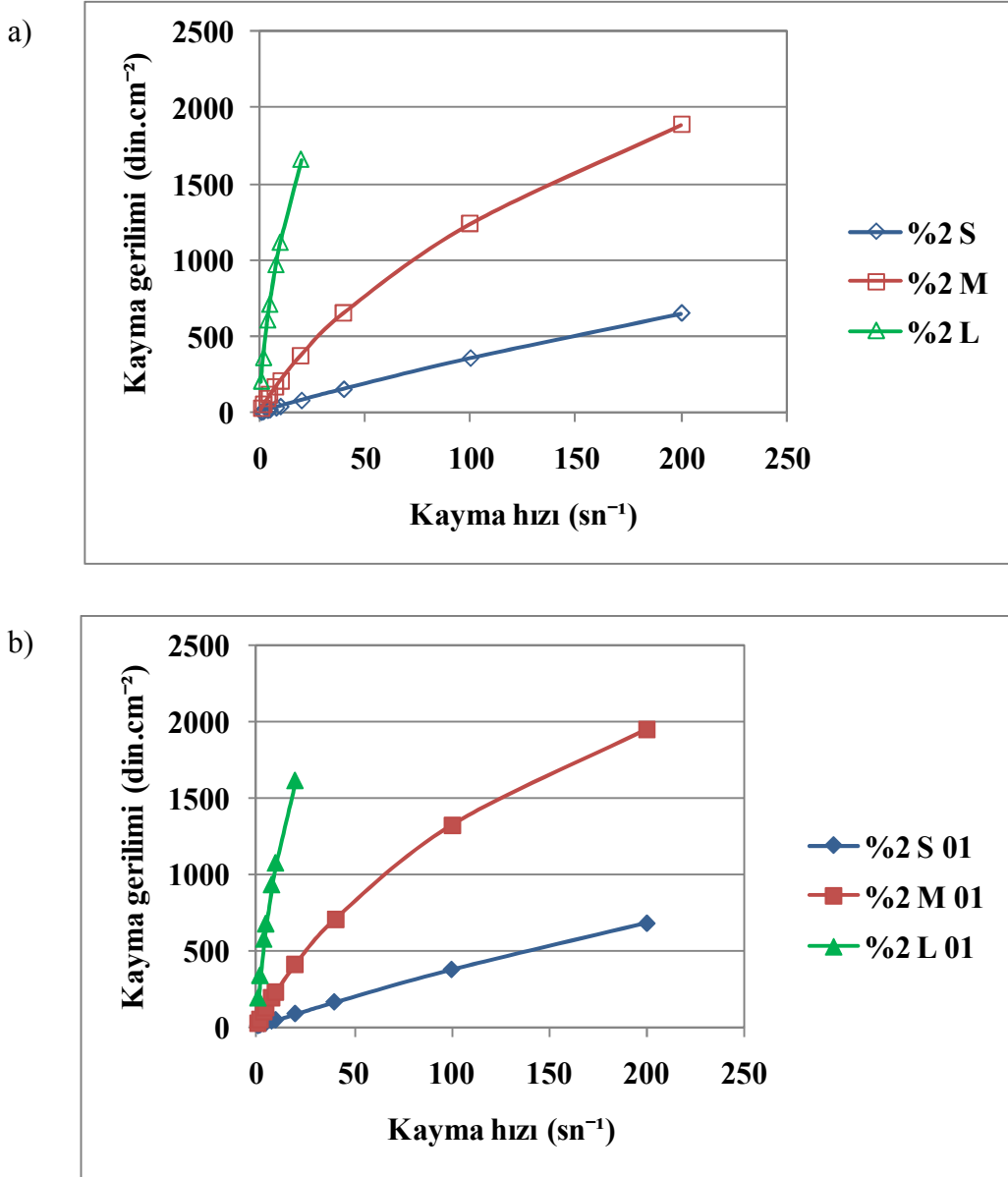
**Tablo 3.7.** Jellerin viskozite değerleri (25±0.1 °C) (n=6)

Formülasyon kodu	Viskozite (cP) ± SS	Formülasyon kodu	Viskozite (cP) ± SS
S	1464.0 ± 10.0	S 01	1588.7 ± 5.77
M	1946.0 ± 54.4	M 01	2059.0 ± 63.7
L	1215.3 ± 22.1	L 01	1287.3 ± 8.50
Sig	3156.7 ± 205	Sig 01	3631.8 ± 239
K	2889.7 ± 47.2	K 01	3335.2 ± 859
P	998.9 ± 5.31	P 01	1058.2 ± 40.8
P-B	878.1 ± 32.7	P-B 01	860.1 ± 77.4

10 rpm'deki viskozite değerlerine bakıldığında orta molekül ağırlıklı (M/Sig) ve yüksek molekül ağırlıklı (L) baz kitosan formülasyonlarına TAC ilavesi viskozitede artışa neden olurken düşük molekül ağırlıklı baz kitosan (S), suda çözünen protasan klorür (P), baz protasan (P-B) ve mantar kaynaklı kitosan (K) formülasyonlarında belirgin değişiklik gözlenmemiştir.

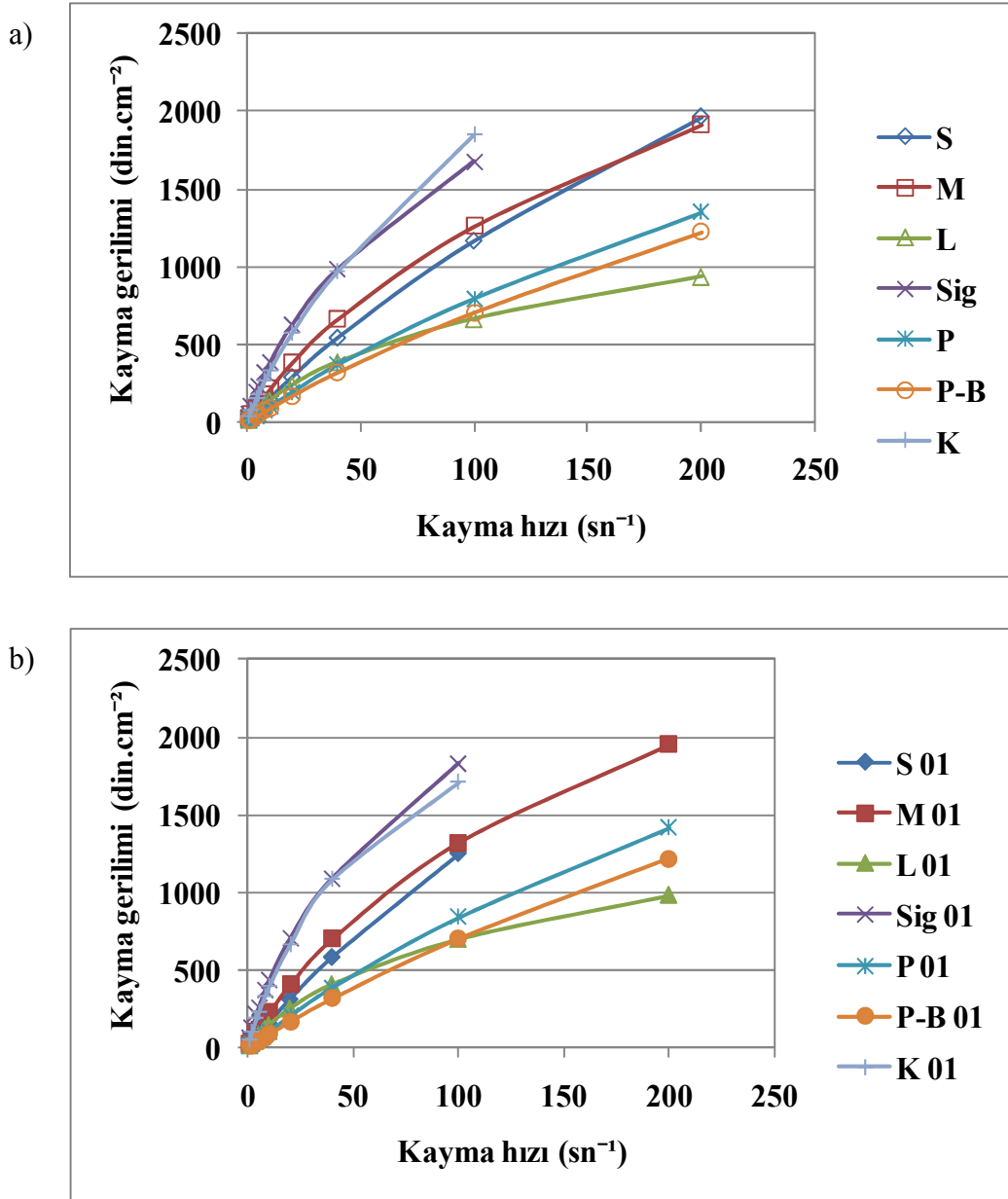
Aynı konsantrasyonda hazırlanan düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan jellerin akış eğrileri Şekil 3.5’de, viskozite eğrileri Şekil 3.7’de gösterilmiştir.

Boş ve etkin madde içeren jellerin akış eğrileri Şekil 3.6’da, viskozite eğrileri Şekil 3.8’de gösterilmiştir.



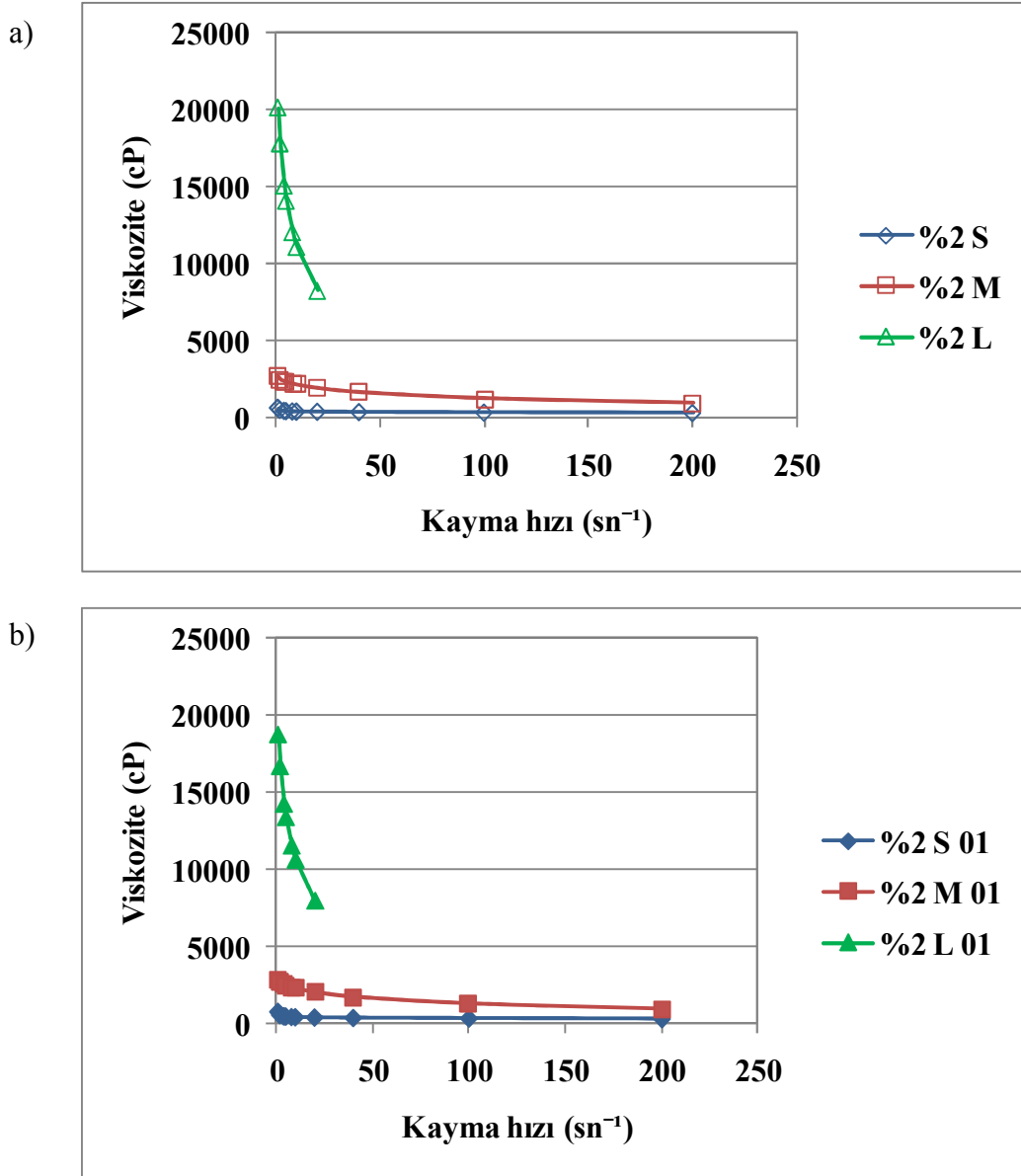
Şekil 3.5. Aynı konsantrasyonda (%2) düşük (S), orta (M) ve yüksek (L) molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış a) boş ve b) etkin madde içeren jellerin akış eğrileri (n=3)

Boş veya etkin madde içeren kitosan jellerin viskozitesi artan molekül ağırlığıyla artmaktadır.



Şekil 3.6. Jellerin akış eğrileri a) boş ve b) etkin madde içeren

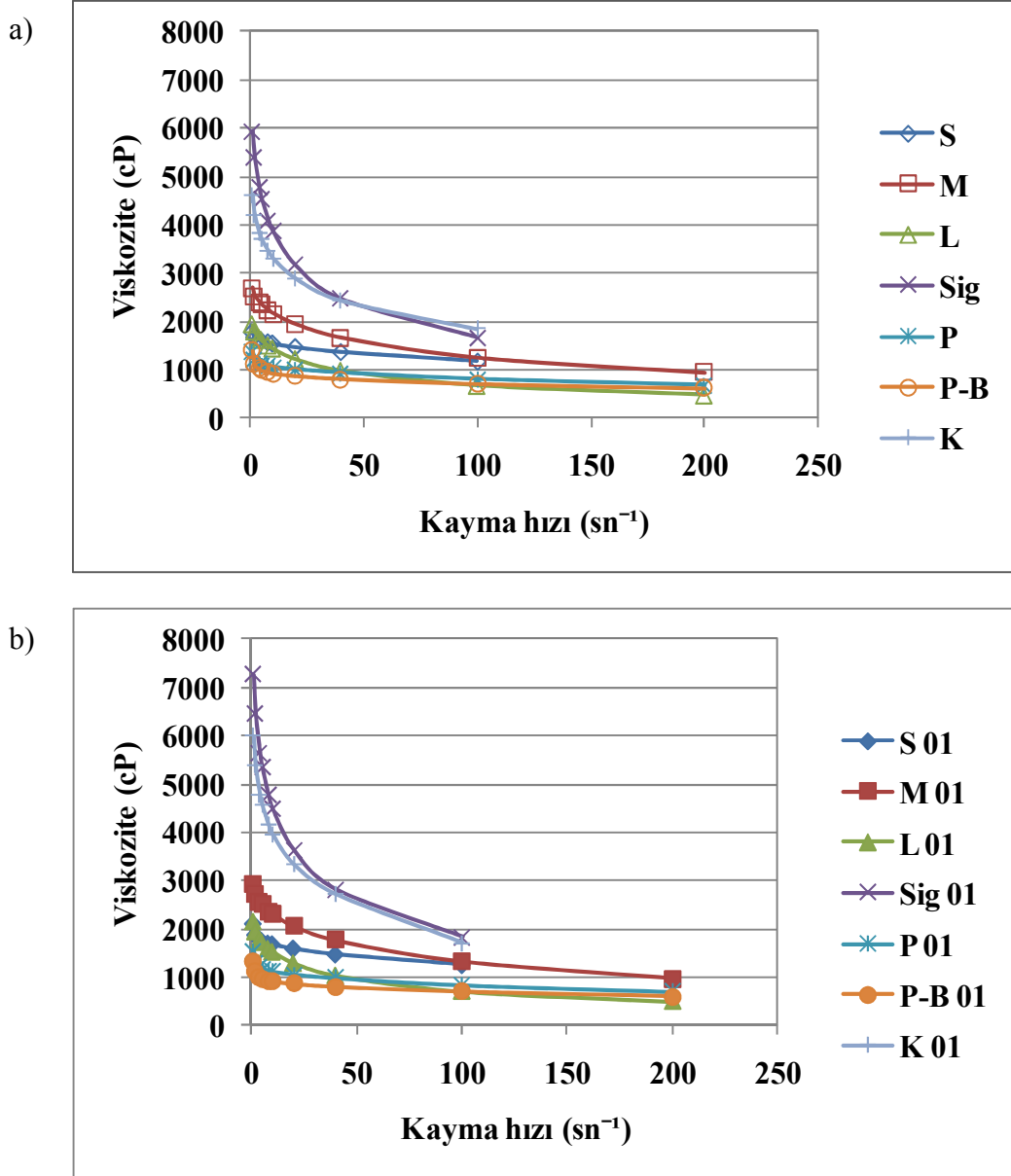
Kitosan jellerin psödoplastik akış tipi gösterdiği görülmüştür.



**Şekil 3.7.** Aynı konsantrasyonda (%2) düşük (S), orta (M) ve yüksek (L) molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış a) boş ve b) etkin madde içeren jellerin viskozite eğrileri

Kayma hızındaki artışla birlikte viskozite değerlerinde azalma gözlenmektedir. Buna kayma ile incelen sistemler adı verilmektedir (shear thinning).

Etkin madde ilavesinin viskozitede değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.

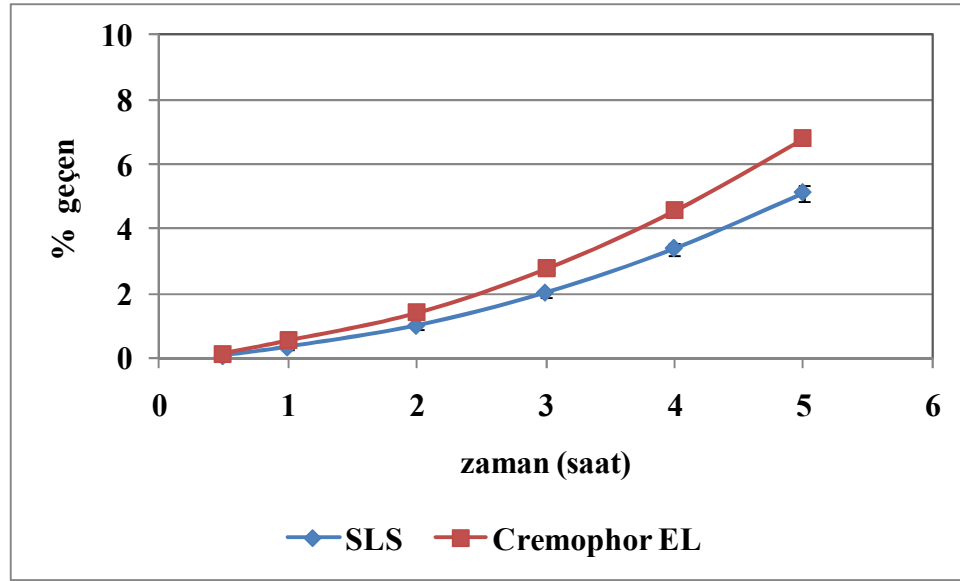


Şekil 3.8. Jellerin viskozite eğrileri a) boş ve b) etkin madde içeren



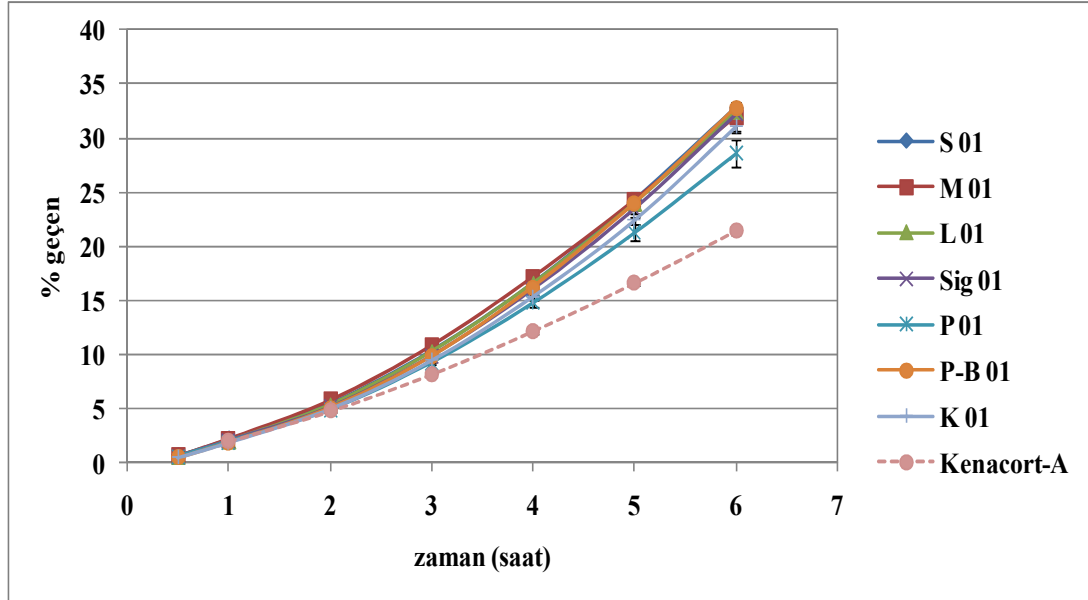
### 3.1.4. İn Vitro Salım Çalışmaları

Triamsinolon asetonitin çözünürlüğü düşük olduğu için salım ortamına yüzey etkin madde eklenmesi gerekmiştir. Sürfaktan yokken oldukça düşük salım değerleri elde edilmiştir. Bu amaçla difüzyon hücreleri kullanılarak % 1 SLS ve Cremophor EL denenmiş (Şekil 3.9), Cremophor EL ile daha fazla sonuç alındığı için deneylere bu yüzey etkin madde ile devam edilmiştir.



Şekil 3.9 Orta molekül ağırlıklı (M) kitosan jelin difüzyon hücresinden salımı üzerine salım ortamına eklenen farklı yüzey etkin maddelerinin etkisi (n=4)

Farklı kitosanlar kullanılarak hazırlanan jellerin ve piyasa preparatı olan Kenacort-A Orabase'ın salım profilleri Şekil 3.10'da verilmiştir.



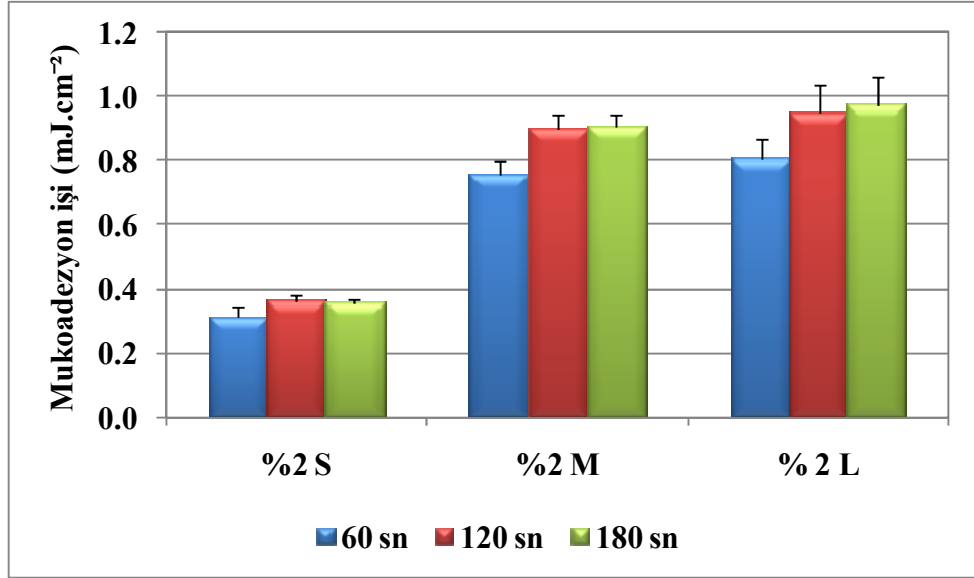
Şekil 3.10. Jellerden triamsinolon asetonitin salım profilleri (n=6)

Bütün jel formülasyonlarında benzer salım profilleri elde edilmiştir ( $f_2 > 50$ ). 6 saat sonunda elde edilen salım verileri karşılaştırıldığında suda çözünen protasan klorür formülasyonu (P 01) dilüe asitte çözünen formülasyonlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Formülasyonlardan salımda 30 dakikalık bir gecikme süresi görülmüştür. Suda çözünen protasan klorür formülasyonu (P 01) sırasıyla 2 ve 4 saat sonunda  $4.9 \pm 0.1$  ve  $14.8 \pm 0.9$ ; baz kitosan formülasyonu (S 01) ise  $5.5 \pm 0.3$  ve  $16.6 \pm 0.5$  salım elde edilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı baz kitosan formülasyonundan (S 01) 6 saat sonunda TAC'ın  $32.8 \pm 0.7$ 'si salınırken, suda çözünen protasan klorür formülasyonundan (P 01)  $28.6 \pm 3.1$ 'inin salındığı gözlenmiştir. Kitosan jellerden etkin madde salımının viskoziteden etkilenmediği görülmektedir.

Piyasa preparatı Kenacort-A Orabase'dan 6 saat sonunda salınan etkin madde miktarı  $21.4 \pm 0.8$ 'dir, salımda 30 dakikalık bir gecikme süresi görülmüştür. Bu çalışmada hazırlanan tüm formülasyonlardan 6 saat sonunda elde edilen ilaç salımı piyasa preparatından elde edilen salıma göre daha yüksektir ( $p < 0.05$ ).

### 3.1.5. Mukoadezyon Çalışmaları

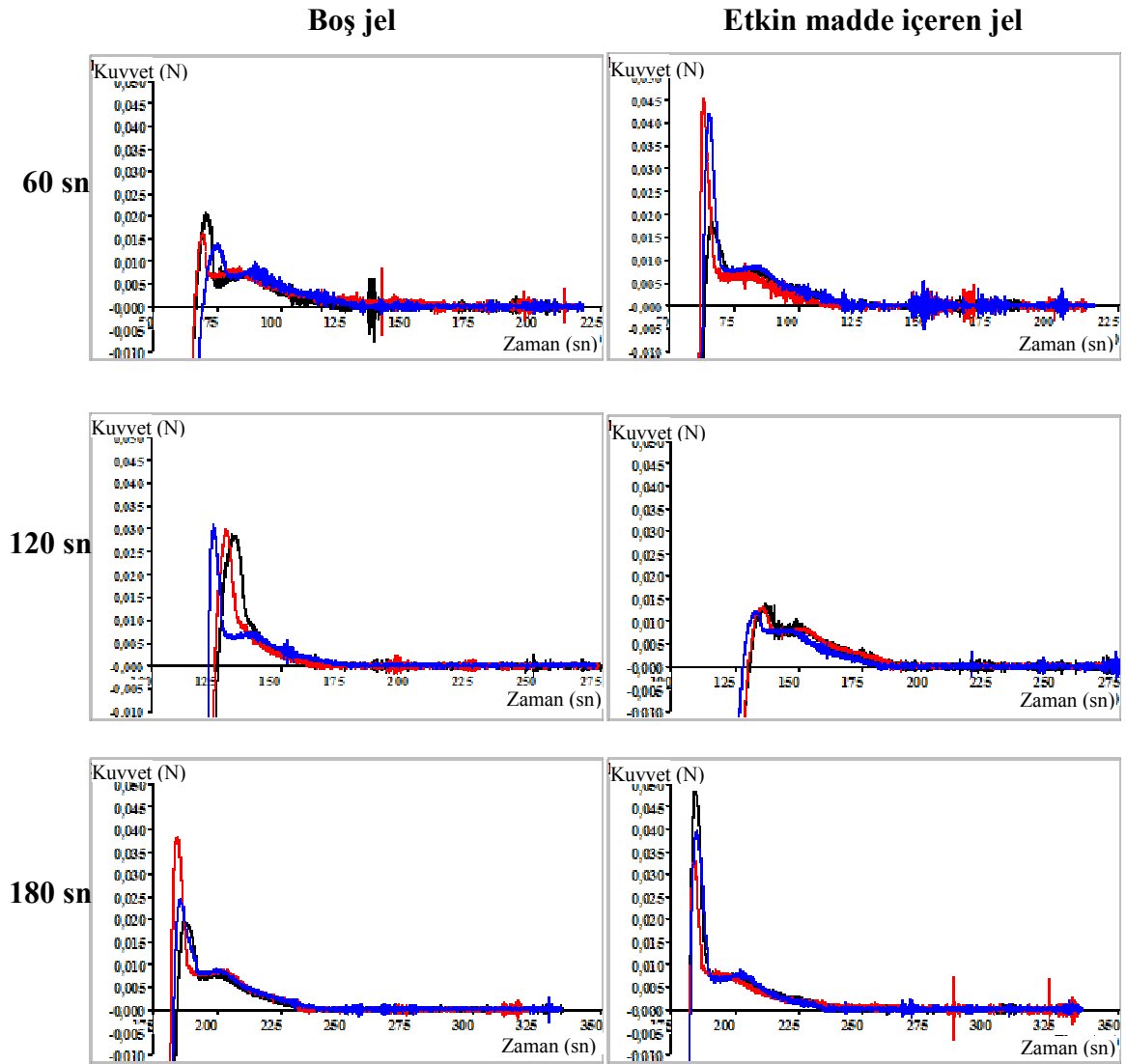
Konsantrasyonları % 2 a/h olacak şekilde farklı molekül ağırlığına sahip baz kitosanlar (S, M ve L) ile hazırlanmış etkin madde içermeyen jellere ait mukoadezyon işi verileri Şekil 3.11’de verilmiştir.



**Şekil 3.11.** Düşük (% 2 S), orta (% 2 M) ve yüksek (% 2 L) molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış etkin madde içermeyen jellerin farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi (n=3)

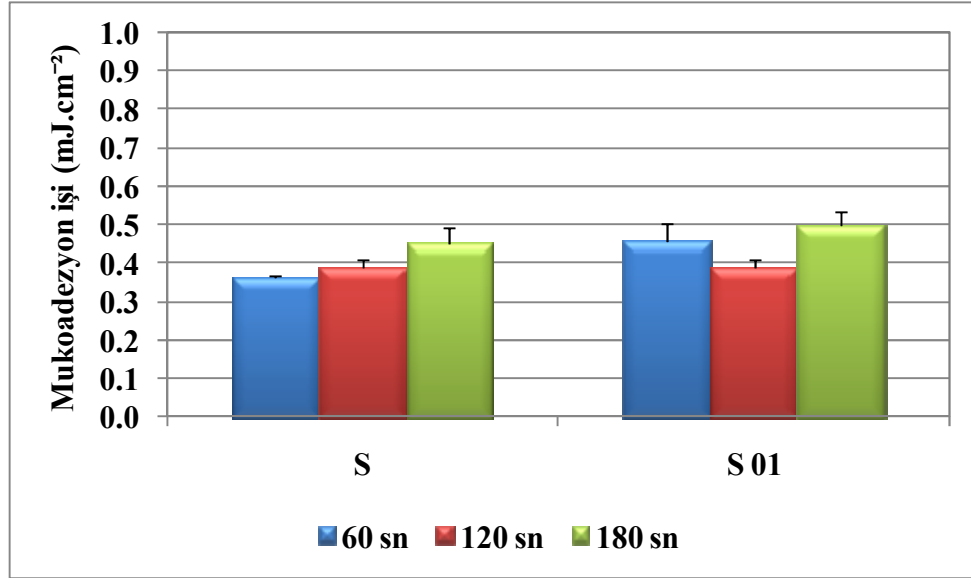
Grafiğe göre molekül ağırlığı arttıkça mukoadezyon işinin arttığı gözlenmektedir. Düşük molekül ağırlığındaki jel için elde edilen mukoadezyon işi orta ve yüksek molekül ağırlığına göre daha düşük bulunmuştur. Orta ile yüksek molekül ağırlığı arasındaki fark önemli bulunmamıştır. İstatistiksel açıdan üç farklı molekül ağırlığına sahip baz kitosanlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu farklılığı istatistiksel olarak yakalayamamanın nedeni örnek sayısının azlığı olabilir. Artan temas süresi jellerin mukoadezif özelliğini değiştirmemiştir.

Boş (S) ve etkin madde içeren (S 01) düşük molekül ağırlıklı baz kitosan için elde edilen kuvvet-zaman eğrileri Şekil 3.12’de ve jelleri mukozadan ayırmak için hesaplanan kuvvet değerleri ise Tablo 3.8’de verilmiştir.



**Şekil 3.12.** Boş (S) ve etkin madde içeren (S 01) düşük molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri

Düşük molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış jeller için elde edilen mukoadezyon işi verileri Şekil 3.13'te gösterilmiştir.



**Şekil 3.13.** Boş (S) ve etkin madde içeren (S 01) düşük molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi (n=3)

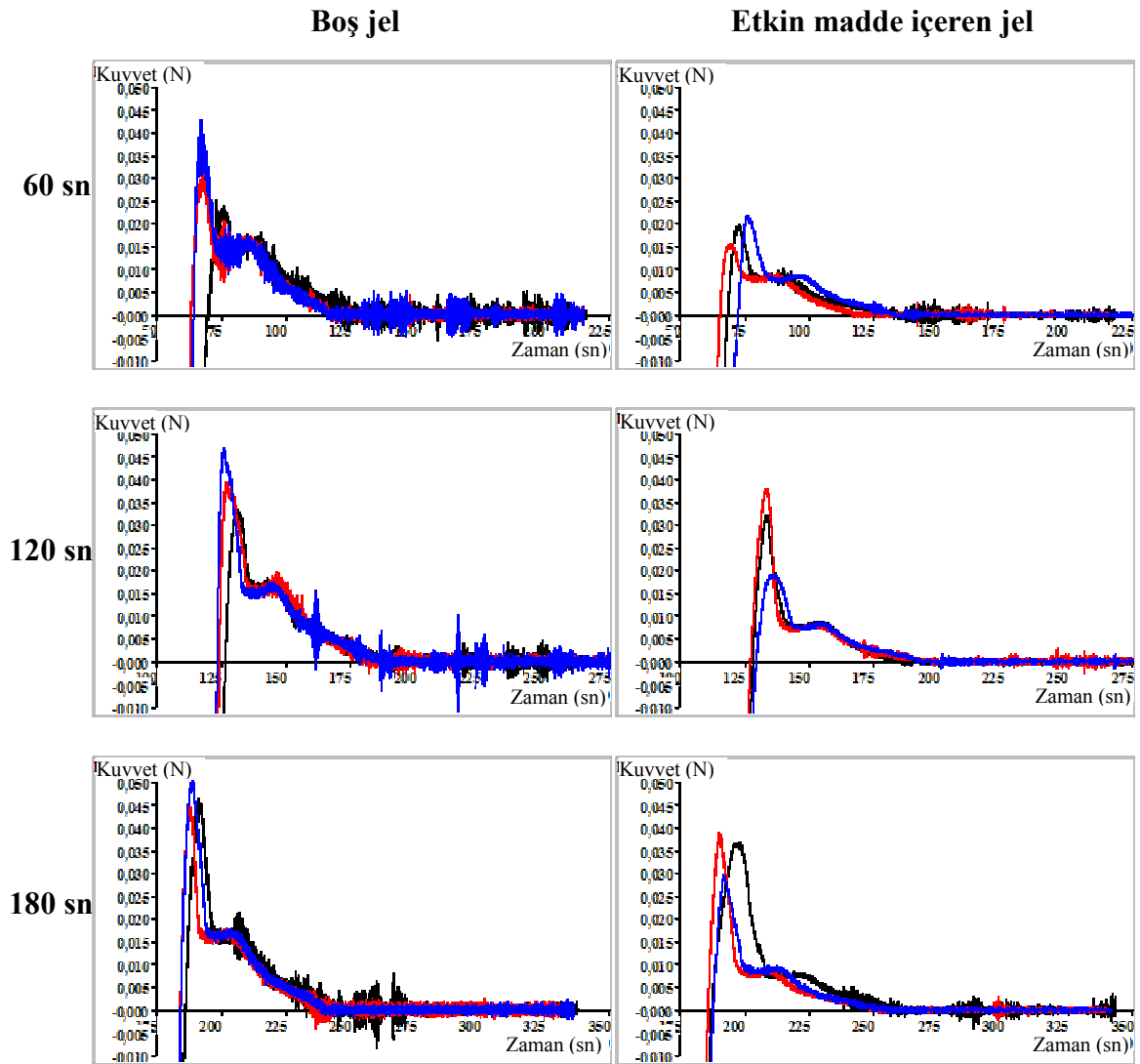
Düşük molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış boş (S) ve etkin madde içeren (S 01) formülasyonlar için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verilerinde etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Etkin madde ilavesi formülasyonların mukoadezif özelliklerini değiştirmemiştir.

Boş (S) ve etkin madde içeren (S 01) jellerde 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verileri için üç zaman arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Mukozayla temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilememiştir.

Üç temas süresi uygulanarak boş düşük molekül ağırlıklı baz kitosan jelini (S) mukozadan ayırmak için gereken ortalama maksimum kuvvet değerleri sırasıyla  $0.0173\pm 0.00335(N)$ ,  $0.0133\pm 0.000702(N)$  ve  $0.0278\pm 0.00967(N)$ ; etkin madde içeren jel (S 01) içinse sırasıyla  $0.0356\pm 0.0146(N)$ ,  $0.0299\pm 0.00105(N)$  ve  $0.0409\pm 0.00734(N)$  olarak bulunmuştur. Etkin madde içeren formülasyonlarda

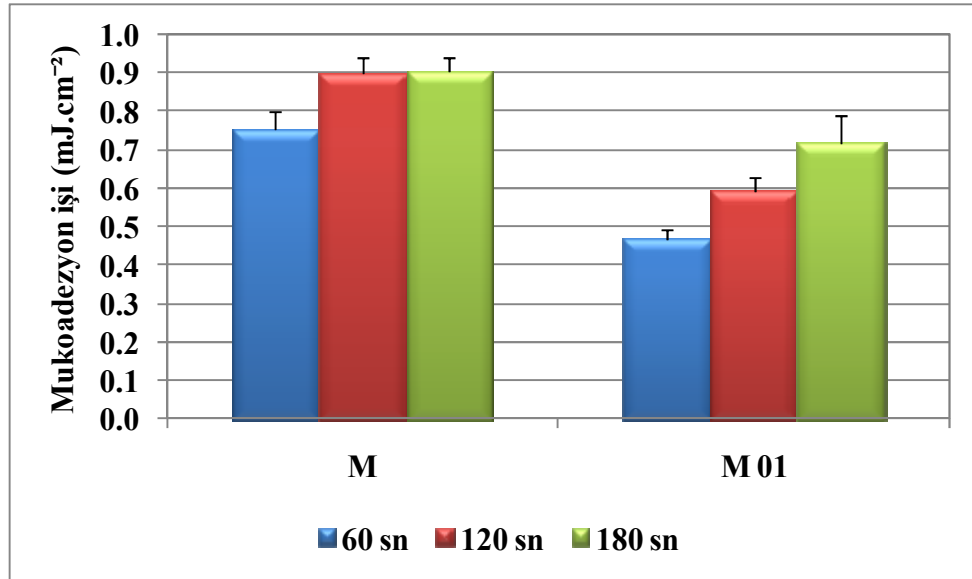
kuvvet değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Temas süresi arttırıldığında daha yüksek mukoadazyon kuvveti sonuçları elde edilmiştir.

Boş (M) ve etkin madde içeren (M 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için elde edilen kuvvet-zaman eğrileri Şekil 3.14’de ve jelleri mukozadan ayırmak için hesaplanan maksimum kuvvet değerleri ise Tablo 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.14. Boş (M) ve etkin madde içeren (M 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri

Orta molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış jeller için elde edilen mukoadezyon işi verileri Şekil 3.15’de gösterilmiştir.



Şekil 3.15. Boş (M) ve etkin madde içeren (M 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi (n=3)

Orta molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış boş (M) ve etkin madde içeren (M 01) formülasyonlar için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verilerinde etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Etkin madde ilavesi formülasyonların mukoadezif özelliklerini değiştirmemiştir.

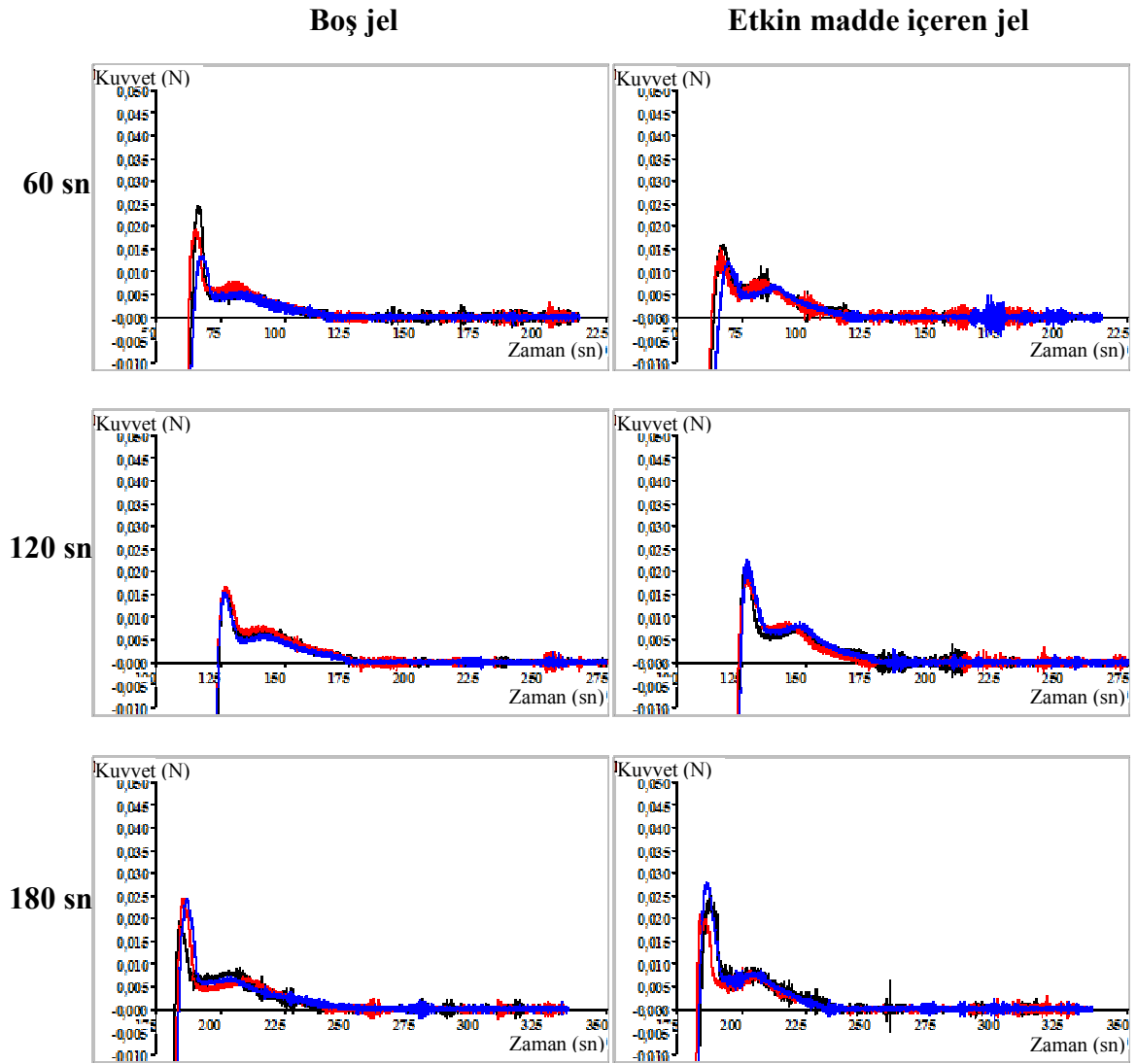
Etkin madde içermeyen M formülasyonu için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verileri için üç zaman arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Mukozayla temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilememiştir.

Grafikte etkin madde içeren M 01 formülasyonu için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verilerinin artan temas süresiyle artış gösterdiği gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak da p değeri 0.05 bulunmuştur. Mukozayla temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilemiştir.

Üç temas süresi uygulanarak boş-orta molekül ağırlıklı baz kitosan jelini (M) mukozadan ayırmak için gereken ortalama maksimum kuvvet değerleri sırasıyla  $0.0341 \pm 0.00885(N)$ ,  $0.0401 \pm 0.00672(N)$  ve  $0.0474 \pm 0.00288(N)$ ; etkin madde içeren jel (M 01) içinse sırasıyla  $0.0193 \pm 0.00314(N)$ ,  $0.0300 \pm 0.00966(N)$  ve  $0.0355 \pm 0.00484(N)$  olarak bulunmuştur. Temas süresi arttırıldığında daha yüksek mukoadesyon kuvveti sonuçları elde edilmiştir. Etkin madde içeren formülasyonlarda kuvvet değerleri boş formülasyona kıyasla daha düşük bulunmuştur.

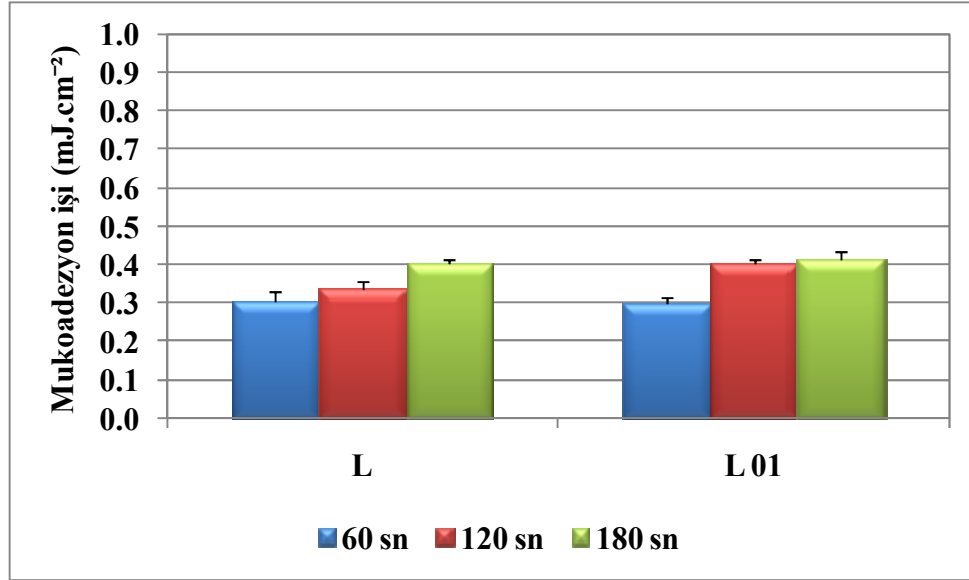


Boş (L) ve etkin madde içeren (L 01) yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan için elde edilen kuvvet-zaman eğrileri Şekil 3.16'da ve jelleri mukozadan ayırmak için hesaplanan maksimum kuvvet değerleri ise Tablo 3.8'de verilmiştir.



**Şekil 3.16.** Boş (L) ve etkin madde içeren (L 01) yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri

Yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış jeller için elde edilen mukoadezyon işi verileri Şekil 3.17’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.17.** Boş (L) ve etkin madde içeren (L 01) yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi (n=3)

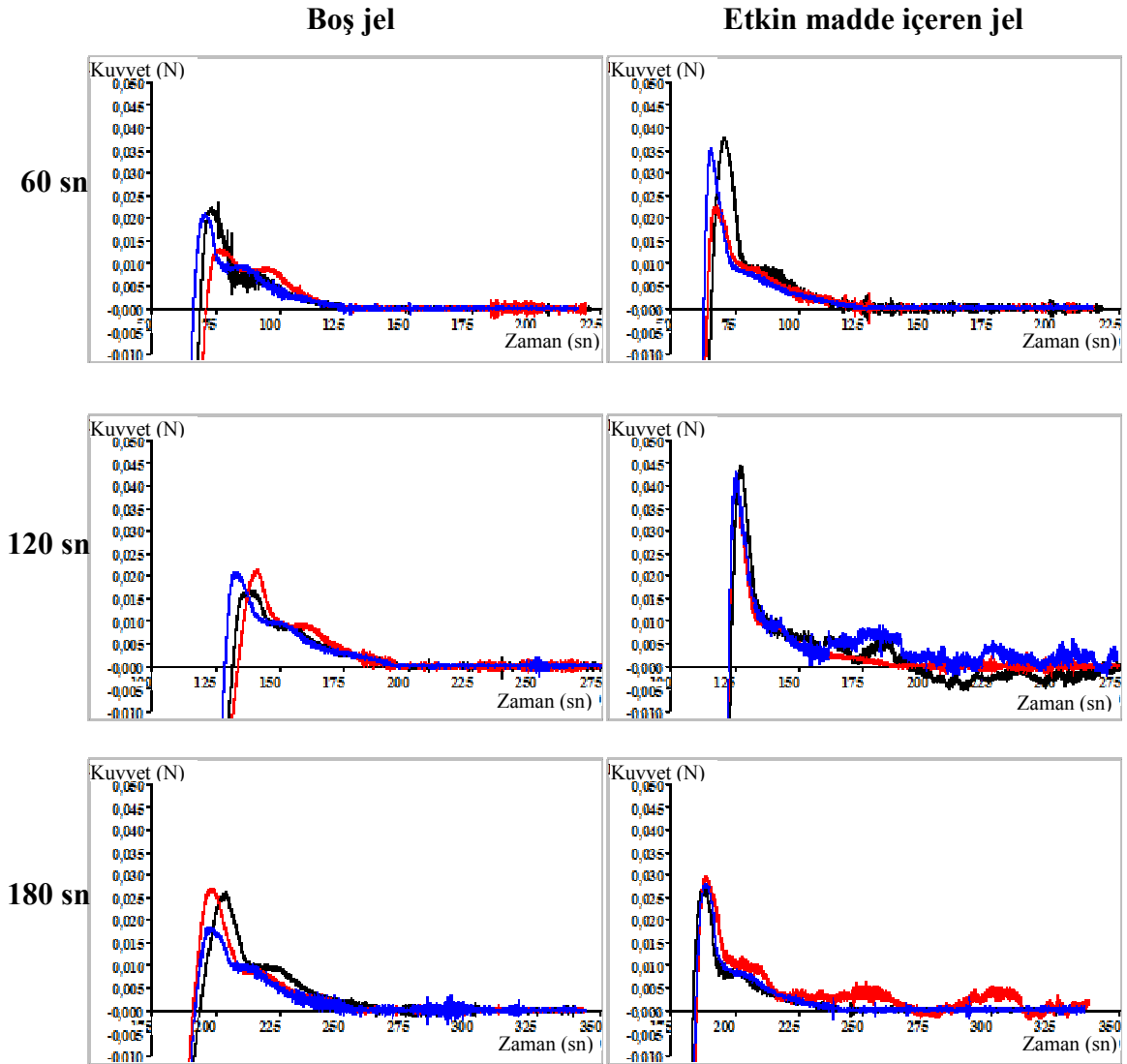
Yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış boş (L) ve etkin madde içeren (L 01) formülasyonlar için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verilerinde etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Etkin madde ilavesi formülasyonların mukoadezif özelliklerini değiştirmemiştir.

Grafikte boş L formülasyonu için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verilerinin artan temas süresiyle artış gösterdiği gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak da p değeri 0.05 bulunmuştur. Mukozayla temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilemiştir.

Etkin madde içeren L 01 formülasyonu için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verileri için üç zaman arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Mukozayla temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilememiştir.

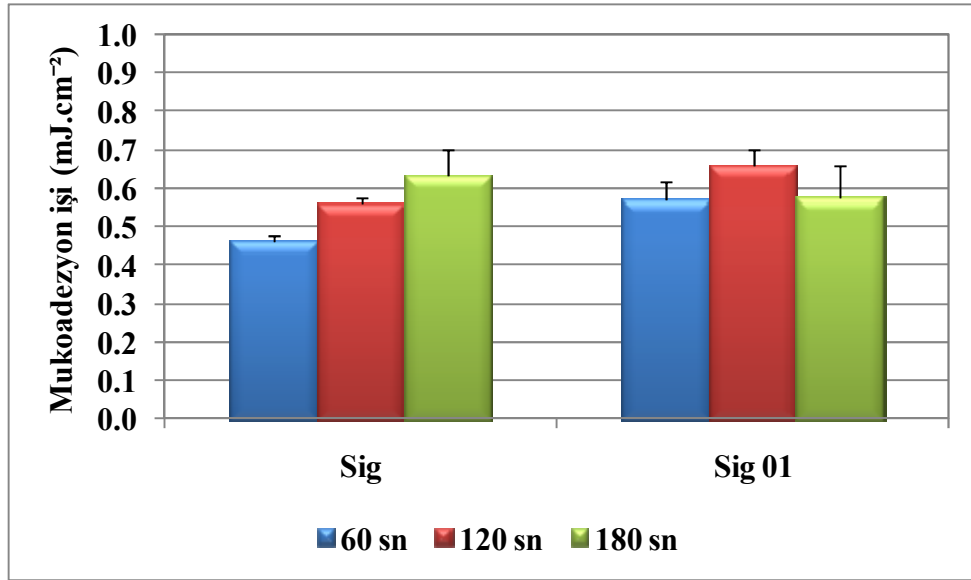
Üç temas süresi uygulanarak boş-yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan jelini (L) mukozadan ayırmak için gereken ortalama maksimum kuvvet değerleri sırasıyla  $0.0193\pm 0.00545(N)$ ,  $0.0162\pm 0.000751(N)$  ve  $0.0228\pm 0.00286(N)$ ; etkin madde içeren jel (L 01) içinse sırasıyla  $0.0147\pm 0.00200(N)$ ,  $0.0211\pm 0.00235(N)$  ve  $0.0249\pm 0.00363(N)$  olarak bulunmuştur. Etkin madde içeren formülasyonda temas süresi arttırıldığında daha yüksek mukoadesyon kuvveti sonuçları elde edilmiştir. Etkin madde içeren formülasyonlarla elde edilen kuvvet değerleri boş formülasyona yakın bulunmuştur.

Boş (Sig) ve etkin madde içeren (Sig 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için elde edilen kuvvet-zaman eğrileri Şekil 3.18’de ve jelleri mukozadan ayırmak için hesaplanan maksimum kuvvet değerleri ise Tablo 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.18. Boş (Sig) ve etkin madde içeren (Sig 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri

Orta molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış jeller için elde edilen mukoadezyon işi verileri Şekil 3.19'da gösterilmiştir.



**Şekil 3.19.** Boş (Sig) ve etkin madde içeren (Sig 01) orta molekül ağırlıklı baz kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi (n=3)

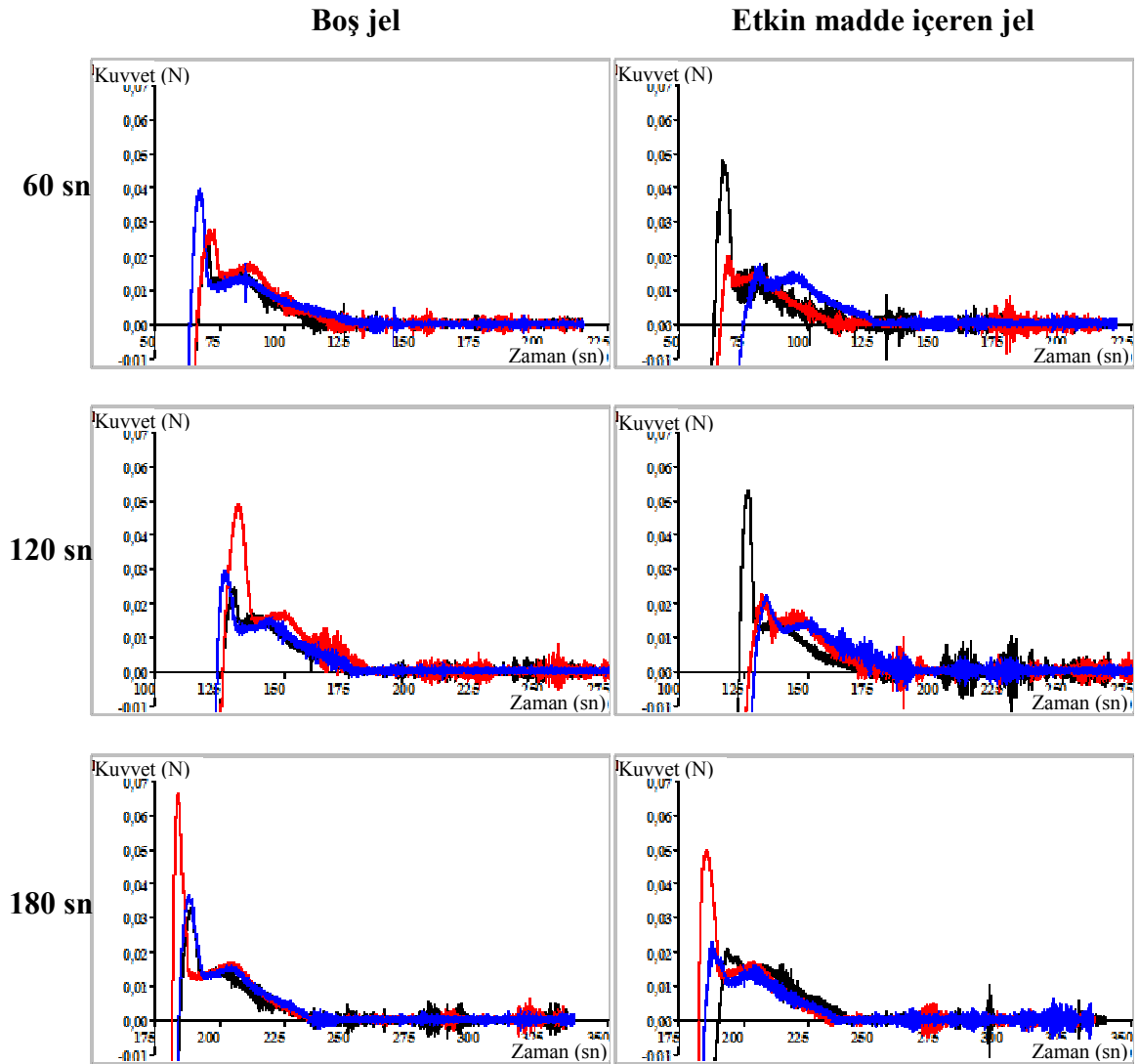
Orta molekül ağırlıklı baz kitosan ile hazırlanmış boş (Sig) ve etkin madde içeren (Sig 01) formülasyonlar için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verilerinde etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Etkin madde ilavesi formülasyonların mukoadezif özelliklerini değiştirmemiştir.

Boş (Sig) ve etkin madde içeren (Sig 01) jellerde 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verileri için üç zaman arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Mukozayla temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilememiştir.

Üç temas süresi uygulanarak boş orta molekül ağırlıklı baz kitosan jelini (Sig) mukozadan ayırmak için gereken ortalama maksimum kuvvet değerleri sırasıyla  $0.0195\pm 0.00545(N)$ ,  $0.0200\pm 0.00261(N)$  ve  $0.0241\pm 0.00465(N)$ ; etkin madde içeren

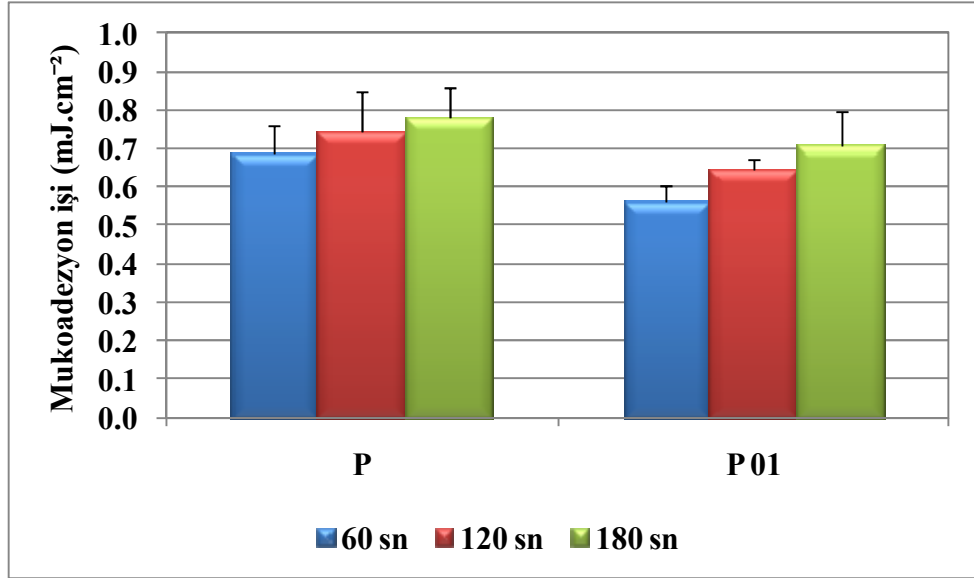
jel (Sig 01) içinse sırasıyla  $0.0323 \pm 0.00817(N)$ ,  $0.0431 \pm 0.00166(N)$  ve  $0.0290 \pm 0.000907(N)$  olarak bulunmuştur. Boş formülasyonlarda temas süresi arttırıldığında daha yüksek mukoadazyon kuvveti sonuçları elde edilmiştir. Ayrıca değerlerin etkin madde içeren formülasyona kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur.

Boş (P) ve etkin madde içeren (P 01) suda çözünen protasan klorür için elde edilen kuvvet-zaman eğrileri Şekil 3.20'de ve jelleri mukozadan ayırmak için hesaplanan maksimum kuvvet değerleri ise Tablo 3.8'de verilmiştir.



**Şekil 3.20.** Boş (P) ve etkin madde içeren (P 01) suda çözünen protasan klorür için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri

Suda çözünen protasan klorür ile hazırlanmış jeller için elde edilen mukoadezyon işi verileri Şekil 3.21’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.21.** Boş (P) ve etkin madde içeren (P 01) suda çözünen protasan klorür için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi (n=3)

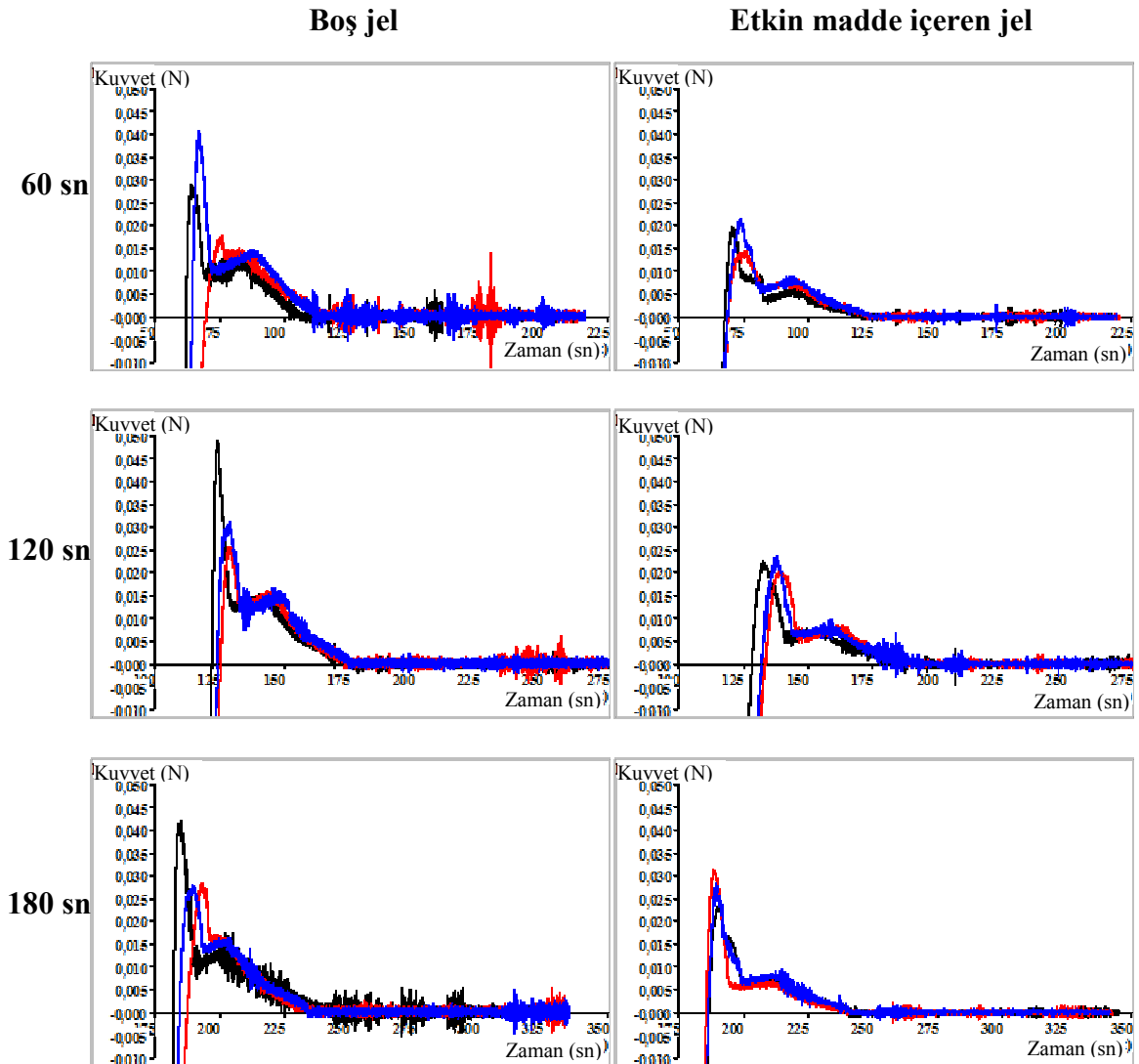
Suda çözünen protasan klorür ile hazırlanmış boş (P) ve etkin madde içeren (P 01) formülasyonlar için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verilerinde etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Etkin madde ilavesi formülasyonların mukoadezif özelliklerini değiştirmemiştir.

Boş (P) ve etkin madde içeren (P 01) jellerde 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verileri için üç zaman arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Mukozayla temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilememiştir.

Üç temas süresi uygulanarak boş-suda çözünen protasan klorür jelini (P) mukozadan ayırmak için gereken ortalama maksimum kuvvet değerleri sırasıyla  $0.0309\pm 0.00816(N)$ ,  $0.0347\pm 0.0129(N)$  ve  $0.0455\pm 0.0184(N)$ ; etkin madde içeren jel (P 01) içinse sırasıyla  $0.0290\pm 0.0166(N)$ ,  $0.0331\pm 0.0177(N)$  ve  $0.0314\pm 0.0161(N)$  olarak bulunmuştur. Boş ve etkin madde içeren formülasyonlarda temas süresi

arttırıldığında daha yüksek mukavemet kuvveti sonuçları elde edilmiştir. Boş ve etkin madde içeren formülasyonlar kıyaslandığında 180 saniye temas süresi dışında değerlerde belirgin fark gözlenmemiştir. 180 saniye temas süresi sonunda boş jel için daha yüksek kuvvet değeri bulunmuştur.

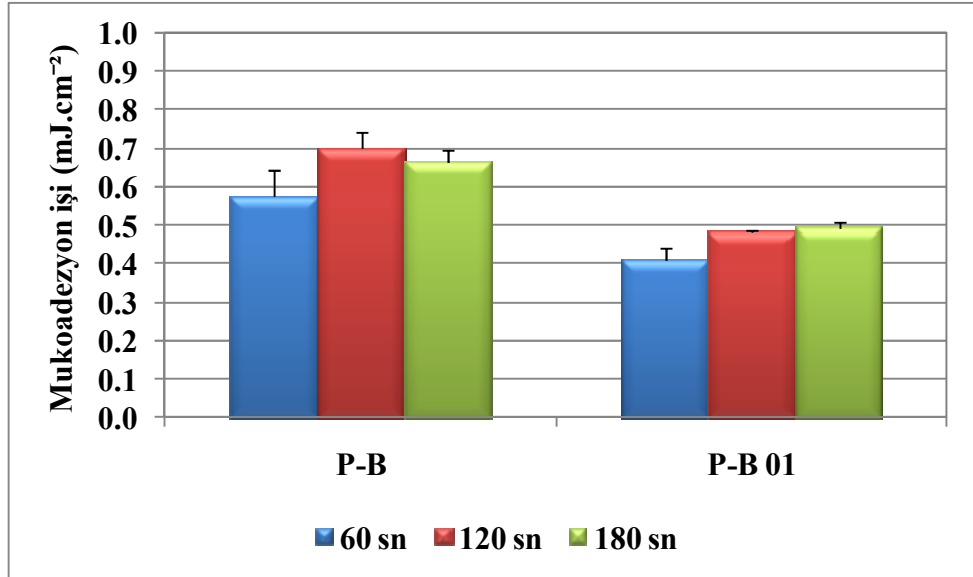
Boş (P-B) ve etkin madde içeren (P-B 01) baz protasan için elde edilen kuvvet-zaman eğrileri Şekil 3.22’de ve jelleri mukozadan ayırmak için hesaplanan maksimum kuvvet değerleri ise Tablo 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.22. Boş (P-B) ve etkin madde içeren (P-B 01) baz protasan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri



Baz protasan ile hazırlanmış jeller için elde edilen mukoadezyon işi verileri Şekil 3.23'te gösterilmiştir



**Şekil 3.23.** Boş (P-B) ve etkin madde içeren (P-B 01) baz protasan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi (n=3)

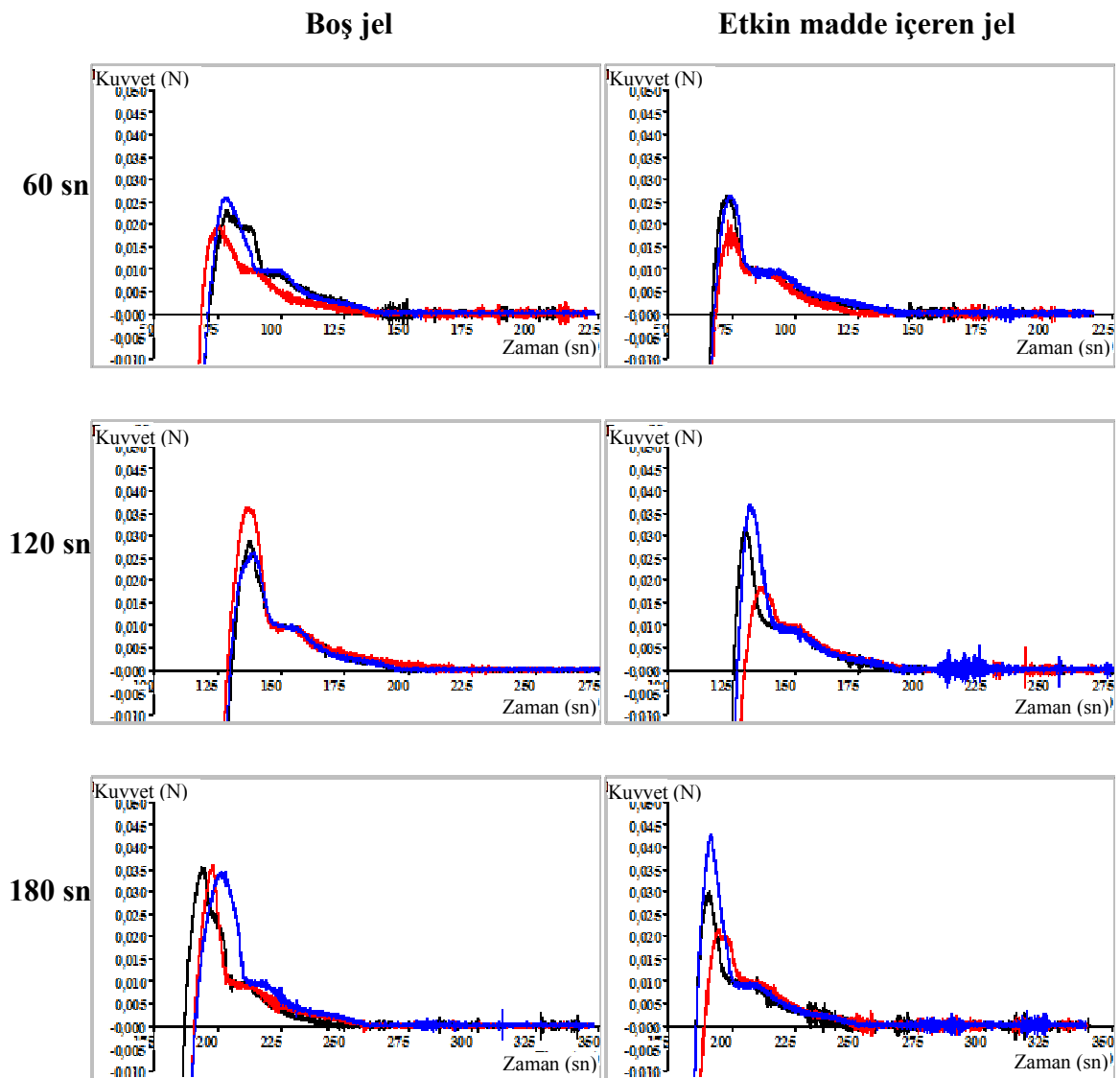
Baz protasan ile hazırlanmış boş (P-B) ve etkin madde içeren (P-B 01) formülasyonlar için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verilerinde etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Etkin madde ilavesi formülasyonların mukoadezif özelliklerini değiştirmemiştir.

Boş (P-B) ve etkin madde içeren (P-B 01) jellerde 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verileri için üç zaman arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Mukozayla temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilememiştir.

Üç temas süresi uygulanarak boş-suda çözünen protasan klorür jelini (P-B) mukozadan ayırmak için gereken ortalama maksimum kuvvet değerleri sırasıyla  $0.0294\pm 0.0115(N)$ ,  $0.0354\pm 0.0121(N)$  ve  $0.0331\pm 0.00809(N)$ ; etkin madde içeren jel (P-B 01) içinse sırasıyla  $0.0188\pm 0.00372(N)$ ,  $0.0224\pm 0.00183(N)$  ve

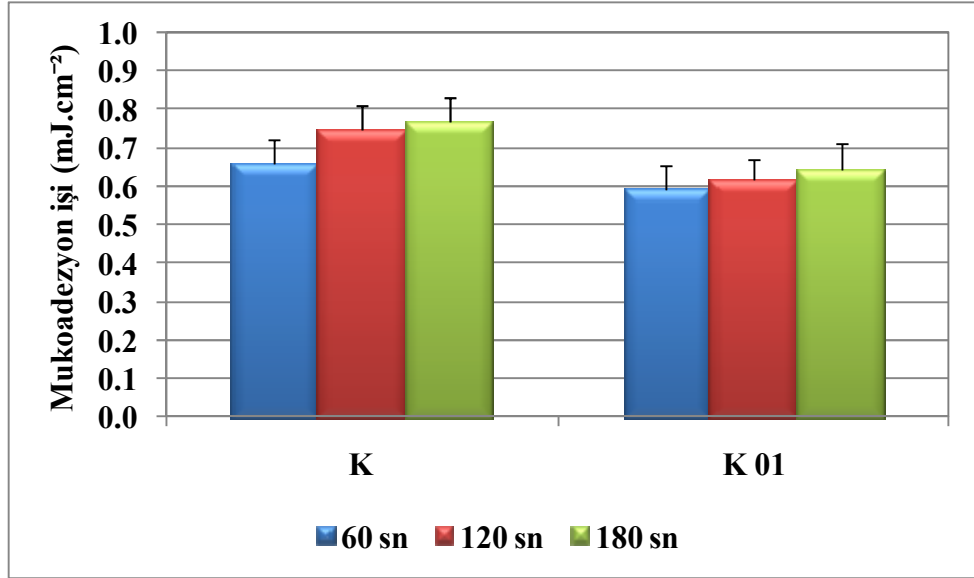
0.0281±0.00399(N) olarak bulunmuştur. Boş ve etkin madde içeren formülasyonlarda temas süresi arttırıldığında daha yüksek mukoadazyon kuvveti sonuçları elde edilmiştir. Ayrıca etkin madde içeren formülasyona kıyasla boş formülasyonlarda değerlerin daha düşük olduğu bulunmuştur.

Boş (K) ve etkin madde içeren (K 01) mantar kaynaklı kitosan için elde edilen kuvvet-zaman eğrileri Şekil 3.24'de ve jelleri mukozadan ayırmak için hesaplanan maksimum kuvvet değerleri ise Tablo 3.8'de verilmiştir.



**Şekil 3.24.** Boş (K) ve etkin madde içeren (K 01) mantar kaynaklı kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen kuvvet-zaman eğrileri

Mantar kaynaklı kitosan ile hazırlanmış jeller için elde edilen mukoadezyon işi verileri Şekil 3.25’de gösterilmiştir



**Şekil 3.25.** Boş (K) ve etkin madde içeren (K 01) mantar kaynaklı kitosan için farklı temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi

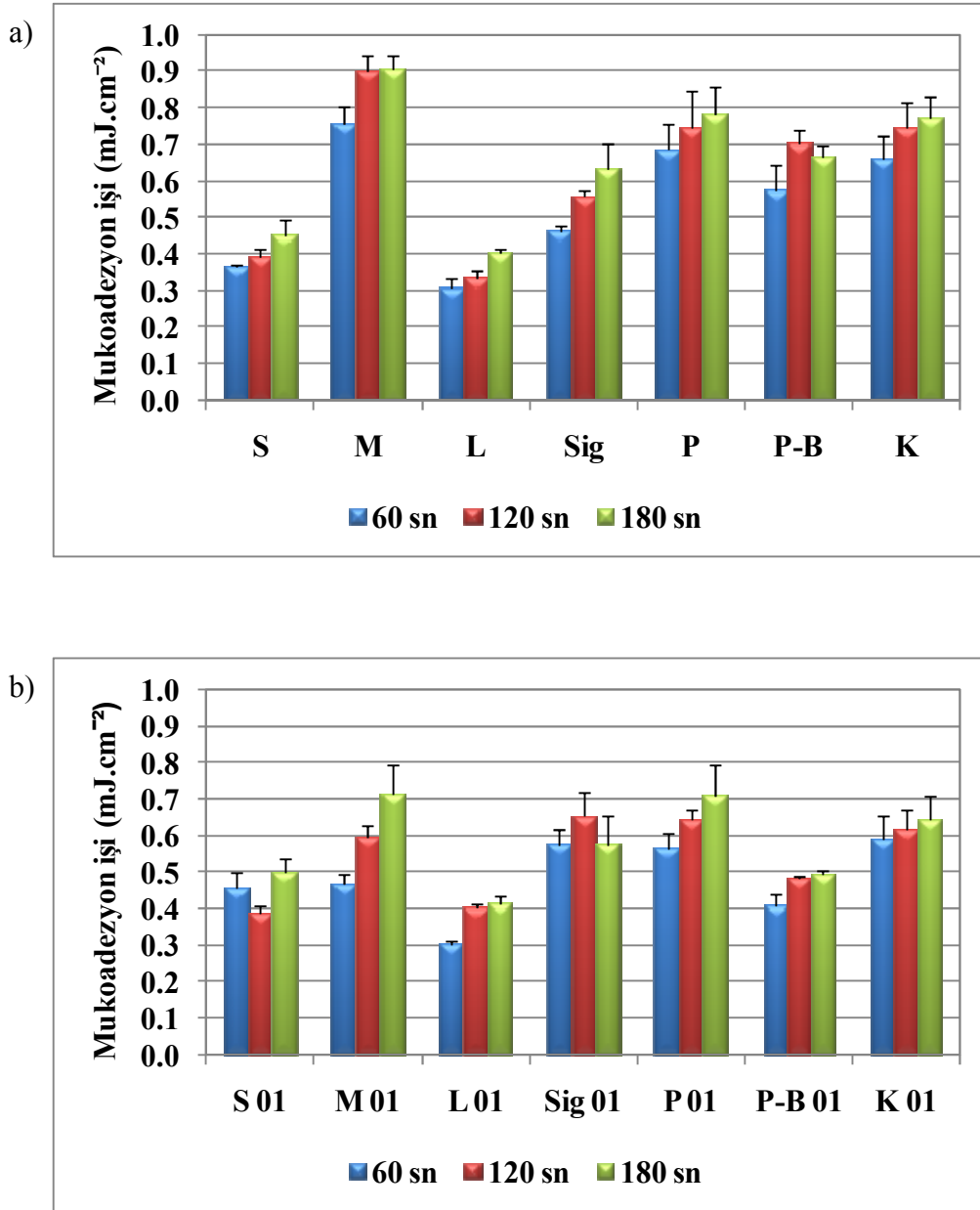
Mantar kaynaklı kitosan ile hazırlanmış boş (K) ve etkin madde içeren (K 01) formülasyonlar için 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verilerinde etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Etkin madde ilavesi formülasyonların mukoadezif özelliklerini değiştirmemiştir.

Boş (K) ve etkin madde içeren (K 01) jellerde 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verileri için üç zaman arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Mukozayla temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilememiştir.

Üç temas süresi uygulanarak boş mantar kaynaklı kitosan jelini (K) mukozadan ayırmak için gereken ortalama maksimum kuvvet değerleri sırasıyla  $0.0233\pm 0.00295(N)$ ,  $0.0308\pm 0.00526(N)$  ve  $0.0356\pm 0.000656(N)$ ; etkin madde içeren jel (K 01) içinse sırasıyla  $0.0248\pm 0.00323(N)$ ,  $0.0291\pm 0.00936(N)$  ve  $0.0318\pm 0.0107(N)$  olarak bulunmuştur. Boş ve etkin madde içeren formülasyonlarda

temas süresi arttırıldığında daha yüksek mukoadezyon kuvveti sonuçları elde edilmiştir. Boş ve etkin madde içeren formülasyonlarla elde edilen kuvvet değerleri arasında belirgin fark gözlenmemektedir.

Çalışmada hazırlanan boş ve etkin madde içeren jellerin mukoadezyon işi verileri toplu olarak Şekil 3.26'da gösterilmiştir.



Şekil 3.26. Jellerin mukoadezyon işi a) boş ve b) etkin madde içeren

Düşük (S), orta (M/Sig), yüksek (L) molekül ağırlıklı baz kitosan, suda çözünen protasan klorür (P), baz protasan (P-B) ve mantar kaynaklı kitosan (K) ile hazırlanmış etkin madde içermeyen formülasyonların 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verileri arasında anlamlı fark bulunmuştur. ( $p < 0.05$ ) Baz kitosanlar arasında orta molekül ağırlıklı jel (M) en iyi mukoadezif özelliği göstermektedir. Elde edildiği kaynağa göre mantar kaynaklı kitosan (K) ile hayvansal kaynaklı-orta molekül ağırlıklı baz kitosan (M) arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Suda çözünen protasan klorür (P) ile baz protasan (P-B) arasındaki fark da istatistiksel açıdan önemli değildir ( $p > 0.05$ ).

Etkin madde içerenlerde ise; düşük (S 01), orta (M 01/ Sig 01), yüksek (L 01) molekül ağırlıklı baz kitosan, suda çözünen protasan klorür (P 01), baz protasan (P-B 01) ve mantar kaynaklı kitosan (K 01) ile hazırlanmış formülasyonların 60, 120 ve 180 saniye temas süresi uygulanarak elde edilen mukoadezyon işi verileri arasında anlamlı fark bulunmuştur. ( $p < 0.05$ ) Baz kitosanlar kıyaslandığında orta molekül ağırlıklı jellerin (M 01/Sig 01) en iyi mukoadezif özelliği gösterdiği gözlenmektedir. Elde edildiği kaynağa göre mantar kaynaklı kitosan (K 01) ile hayvansal kaynaklı-orta molekül ağırlıklı baz kitosan (M 01) arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Suda çözünen protasan klorür (P 01) ile baz protasan (P-B 01) arasındaki fark da istatistiksel açıdan önemli değildir ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 3.8.** Kitosan jellerin mukoadezif özellikleri (n=3)

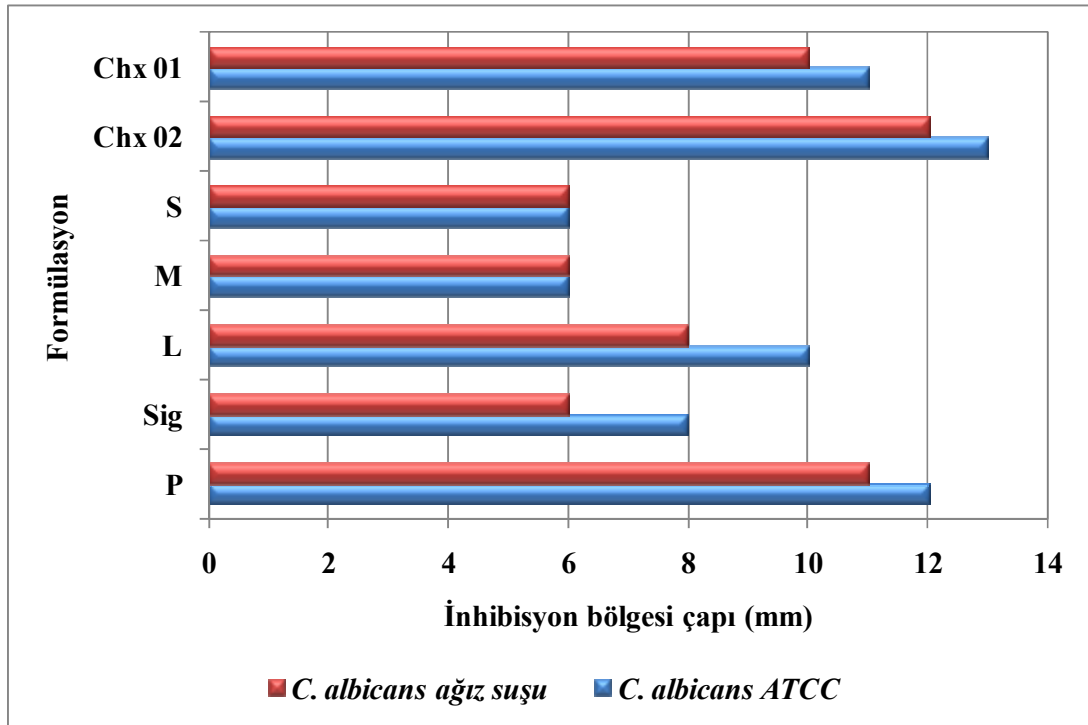
<b>Formülasyon</b>	<b>Temas Süresi (s)</b>	<b>Kuvvet (N)±SS</b>	<b>Adezyon işi (mJ)±SS</b>	<b>Mukoadezyon işi (mJ.cm<sup>-2</sup>)±SS</b>
<b>S</b>	60	0.0173 ± 0.00335	0.286 ± 0.00854	0.364 ± 0.0109
	120	0.0133 ± 0.000702	0.307 ± 0.0269	0.391 ± 0.0342
	180	0.0278 ± 0.00967	0.355 ± 0.0565	0.452 ± 0.0719
<b>S 01</b>	60	0.0356 ± 0.0146	0.360 ± 0.0573	0.459 ± 0.0729
	120	0.0299 ± 0.00105	0.305 ± 0.0255	0.389 ± 0.0325
	180	0.0409 ± 0.00734	0.391 ± 0.0497	0.498 ± 0.0633
<b>M</b>	60	0.0341 ± 0.00885	0,593 ± 0.0630	0.755 ± 0.0802
	120	0.0401 ± 0.00672	0.707 ± 0.0554	0.900 ± 0.0706
	180	0.0474 ± 0.00288	0.709 ± 0.0503	0.903 ± 0.0640
<b>M 01</b>	60	0.0193 ± 0.00314	0.368 ± 0.0356	0.468 ± 0.0453
	120	0.0300 ± 0.00966	0.466 ± 0.0468	0.594 ± 0.0595
	180	0.0355 ± 0.00484	0.562 ± 0.104	0.715 ± 0.132
<b>L</b>	60	0.0193 ± 0.00545	0.239 ± 0.0352	0.305 ± 0.0449
	120	0.0162 ± 0.000751	0.262 ± 0.0285	0.334 ± 0.0363
	180	0.0228 ± 0.00286	0.317 ± 0.0129	0.403 ± 0.0164
<b>L 01</b>	60	0.0147 ± 0.00200	0.236 ± 0.0165	0.300 ± 0.0210
	120	0.0211 ± 0.00235	0.315 ± 0.0167	0.401 ± 0.0213
	180	0.0249 ± 0.00363	0.324 ± 0.0273	0.413 ± 0.0348
<b>Sig</b>	60	0.0195 ± 0.00545	0.361 ± 0.0218	0.459 ± 0.0278
	120	0.0200 ± 0.00261	0.439 ± 0.0205	0.559 ± 0.0261
	180	0.0241 ± 0.00465	0.498 ± 0.0886	0.634 ± 0.113
<b>Sig 01</b>	60	0.0323 ± 0.00817	0.450 ± 0.0611	0.573 ± 0.0778
	120	0.0431 ± 0.00166	0.516 ± 0.0829	0.657 ± 0.106
	180	0.0290 ± 0.000907	0.451 ± 0.113	0.574 ± 0.144
<b>P</b>	60	0.0309 ± 0.00816	0.539 ± 0.0963	0.687 ± 0.123
	120	0.0347 ± 0.0129	0.584 ± 0.142	0.744 ± 0.181
	180	0.0455 ± 0.0184	0.613 ± 0.105	0.781 ± 0.134

<b>P 01</b>	60	$0.0290 \pm 0.0166$	$0.441 \pm 0.0585$	$0.562 \pm 0.0745$
	120	$0.0331 \pm 0.0177$	$0.506 \pm 0.0361$	$0.644 \pm 0.0460$
	180	$0.0314 \pm 0.0161$	$0.557 \pm 0.117$	$0.709 \pm 0.149$
<b>P-B</b>	60	$0.0294 \pm 0.0115$	$0.452 \pm 0.0941$	$0.575 \pm 0.120$
	120	$0.0354 \pm 0.0121$	$0.552 \pm 0.0519$	$0.703 \pm 0.0660$
	180	$0.0331 \pm 0.00809$	$0.520 \pm 0.0443$	$0.662 \pm 0.0564$
<b>P-B 01</b>	60	$0.0188 \pm 0.00372$	$0.322 \pm 0.0410$	$0.410 \pm 0.0522$
	120	$0.0224 \pm 0.00183$	$0.379 \pm 0.00493$	$0.483 \pm 0.00628$
	180	$0.0281 \pm 0.00399$	$0.386 \pm 0.0205$	$0.492 \pm 0.0261$
<b>K</b>	60	$0.0233 \pm 0.00295$	$0.518 \pm 0.0833$	$0.660 \pm 0.106$
	120	$0.0308 \pm 0.00526$	$0.586 \pm 0.0899$	$0.747 \pm 0.115$
	180	$0.0356 \pm 0.000656$	$0.605 \pm 0.0838$	$0.771 \pm 0.107$
<b>K 01</b>	60	$0.0248 \pm 0.00323$	$0.465 \pm 0.0856$	$0.592 \pm 0.109$
	120	$0.0291 \pm 0.00936$	$0.483 \pm 0.0715$	$0.615 \pm 0.0910$
	180	$0.0318 \pm 0.0107$	$0.505 \pm 0.0901$	$0.643 \pm 0.115$

Bu çalışmada, jelleri mukozadan ayırmak için gerekli maksimum kuvvet ölçülmüştür. En küçük değer düşük molekül ağırlıklı baz kitosan (S) formülasyonunda  $0.0133 \pm 0.000702$  N; en yüksek değer ise orta molekül ağırlıklı baz kitosan (M) formülasyonunda  $0.0474 \pm 0.00288$  N olarak gözlenmiştir.

### 3.1.6. Mikrobiyolojik Çalışmalar

Şekil 3.27’de kitosan jellerin *C. albicans* için disk difüzyon testi ile elde edilen inhibisyon bölgesi çapları verilmiştir.



Şekil 3.27. Boş kitosan jellerin, % 0.1 ve 0.2’lik Chx solüsyonlarının *C. albicans* için disk difüzyonla belirlenen inhibisyon bölgesi çapı değerleri (n=2)

Elde edilen bulgulara göre suda çözünen protasan klorürün (P) *C. albicans* izole ağız suşu ve standart (ATCC) suşu için inhibisyon bölgesi çapı değerleri sırasıyla 11 ve 12 mm bulunmuştur. Protasan klorürün *Candida albicans* üzerine etkili kitosan olduğu ve kontrol olarak kullanılan % 0.1’lik klorheksidin glukonat çözeltisine benzer inhibisyon bölgesi çapı gösterdiği gözlenmektedir. Düşük (S) ve orta (M) için inhibisyon bölgesi çapı değerleri 6 mm, orta (Sig) için 6-8 mm ve yüksek molekül ağırlıklı (L) baz kitosan için 8-10 mm bulunmuştur. Baz kitosanlarda ise en fazla aktivite yüksek molekül ağırlıklı kitosan jelde (L) gözlenmiştir. Düşük (S) ve orta molekül ağırlıklı (M/Sig) jeller ise birbirine yakın etki göstermiştir. Orta



molekül ağırlıklı Sig formülasyonunun standart suşa karşı daha etkili olduğu bulunmuştur.

Genel olarak standart suş üzerine kitosanların etkisinin izole ağız suşuna göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni *Candida* türlerinin ortam şartlarına, antimikrobiyallere karşı direnç kazanması olabilmektedir.

Tablo 3.9’da kitosan jellerin *C. albicans* için broth makrodilüsyon testi ile elde edilen MİK sonuçları verilmiştir.

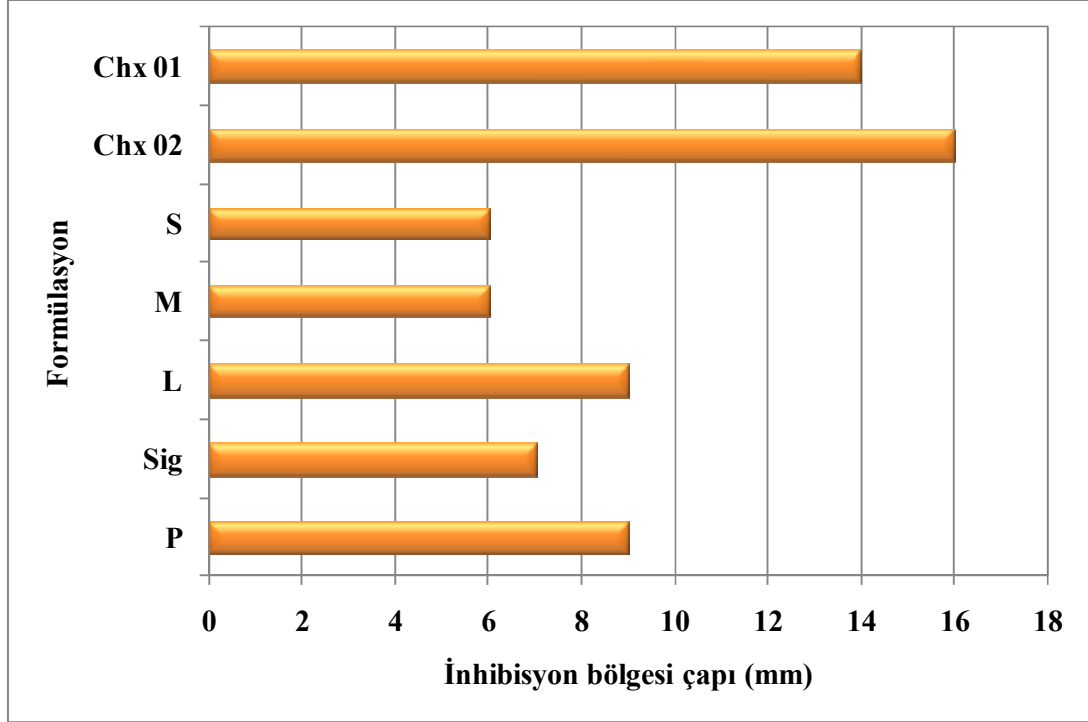
**Tablo 3.9.** Kitosan jellerin *C. albicans* için MİK değerleri (n=2)

Formülasyon	<i>C. albicans</i> (ATCC)	<i>C. albicans</i> (ağız suşu)
	MİK (mg/mL)	MİK (mg/mL)
S	>30	>30
M	20	20
L	>10	>10
Sig	10	10
P	15	15

Düşük molekül ağırlıklı (S) baz kitosanının minimum inhibitör konsantrasyonu 30 mg/mL’nin üzerinde bulunmuştur. Bu doğrultuda S formülasyonunun antifungal etkisinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Orta molekül ağırlıklı (M/Sig) kitosanlar için sırasıyla 20 ve 10 mg/mL MİK değerleri elde edilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı (L) baz kitosanının MİK değeri 10 mg/mL’nin üzerinde bulunmuştur. Suda çözünen protasan klorür (P) için MİK değeri ise 15 mg/mL bulunmuştur. Artan molekül ağırlığı ile inhibitör etkinin arttığı görülmüştür (L > M > S).

*C. albicans* için MFK değeri elde edilememiştir. Diğer bir deyişle formülasyonlar *Candida* için öldürücü etki göstermemiştir.

Şekil 3.28’de kitosan jellerin *P. gingivalis* için disk difüzyon testi ile elde edilen inhibisyon bölgesi çapları verilmiştir.



**Şekil 3.28.** Boş kitosan jellerin, % 0.1 ve 0.2’lik Chx solüsyonlarının *P. gingivalis* için disk difüzyonla belirlenen inhibisyon bölgesi çap değerleri (n=2)

Suda çözünen protasan klorür (P) ve yüksek molekül ağırlıklı (L) baz kitosanın inhibisyon bölgesi çapı değerleri 9 mm olarak bulunmuştur. Bu iki kitosanın *P. gingivalis* suşu için elde edilen inhibisyon bölgesi çapı değerleri diğer kitosanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Düşük molekül ağırlıklı (S) baz kitosan için inhibisyon bölgesi çapı değeri 6 mm ve orta molekül ağırlıklı (M/Sig) için 6/7 mm bulunmuştur. Düşük (S) ve orta molekül ağırlıklı (M/Sig) kitosan jeller birbirine yakın etki göstermekle birlikte Sig formülasyonu M’den daha etkili bulunmuştur. Formülasyonların tümü % 0.1’lik klorheksidin glukonat çözeltisinden daha düşük inhibitör etki göstermiştir.

Tablo 3.10’da kitosan jellerin *P. gingivalis* için broth makrodilüsyon testi ile elde edilen MİK sonuçları verilmiştir.

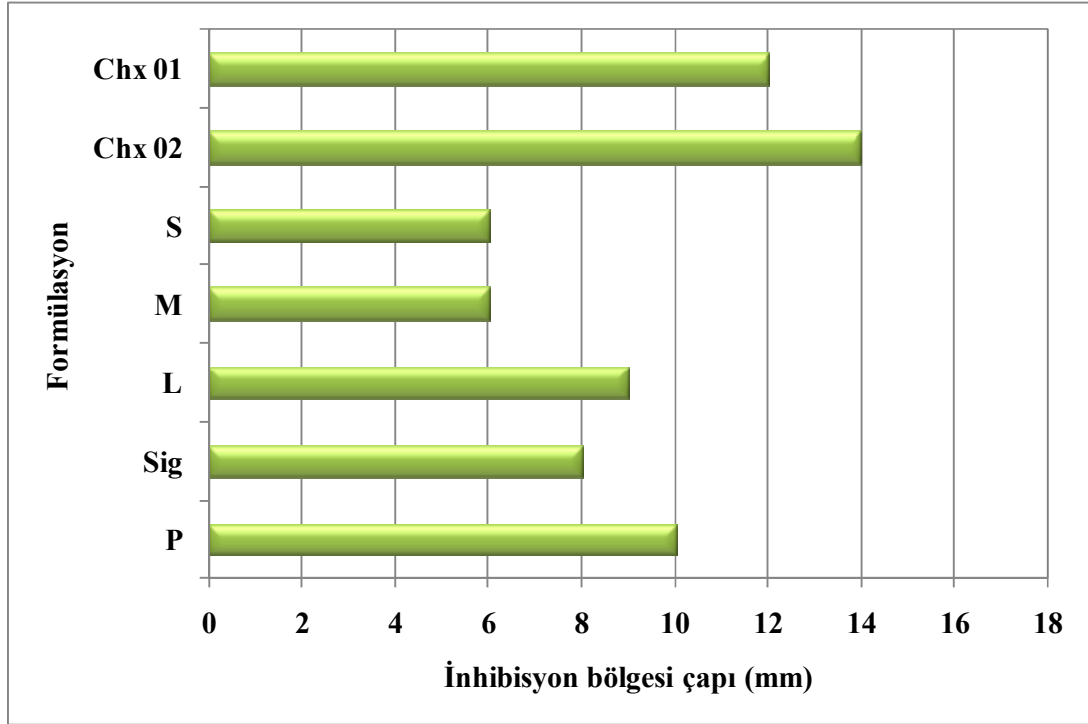
**Tablo 3.10.** Kitosan jellerin *P. gingivalis* için MİK değerleri (n=2)

Formülasyon	<i>P. gingivalis</i>
	MİK (mg/mL)
S	>30
M	20
L	5
Sig	10
P	3.75

Düşük molekül ağırlıklı (S) baz kitosanının minimum inhibitör konsantrasyonu 30 mg/mL’nin üzerinde bulunmuştur, dolayısıyla *P. gingivalis* üzerine antibakteriyel etkisinin oldukça düşük olduğu saptanmıştır. Orta molekül ağırlıklı (M/Sig) kitosanlar için sırasıyla 20 ve 10 mg/mL MİK değerleri elde edilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı (L) baz kitosanının MİK değeri 5 mg/mL, suda çözünen protasan klorür (P) içinse 3.75 mg/mL bulunmuştur. Tüm formülasyonlar içinde en düşük MİK değeri suda çözünen protasan klorür (P) için, baz kitosanlar arasında ise yüksek molekül ağırlıklı kitosan (L) jeli için bulunmuştur. Jel formülasyonların *P. gingivalis*’e karşı antibakteriyel etkinlikleri şu şekilde sıralanabilir: P > L > Sig > M > S. Artan molekül ağırlığı ile inhibitör etkinin arttığı görülmüştür.

*P. gingivalis* için MBK değeri elde edilememiştir. Diğer bir deyişle formülasyonlar *P. gingivalis* için öldürücü etki göstermemiştir.

Şekil 3.29'da kitosan jellerin *A. actinomycetemcomitans* için disk difüzyon testi ile elde edilen inhibisyon bölgesi çapları verilmiştir.



Şekil 3.29. Boş kitosan jellerin, % 0.1 ve 0.2'lik Chx solüsyonlarının *A. actinomycetemcomitans* için disk difüzyonla belirlenen inhibisyon bölgesi çap değerleri (n=2)

Suda çözünen protasan klorürün (P) *A. actinomycetemcomitans* suşu için elde edilen inhibisyon bölgesi çapı değeri (10 mm) diğer kitosanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Düşük molekül ağırlıklı (S) baz kitosan için inhibisyon bölgesi çapı değeri 6 mm, orta molekül ağırlıklı (M/Sig) için 6/8 mm, yüksek molekül ağırlıklı (L) için 9 mm bulunmuştur. Baz kitosanlar içinde en fazla antibakteriyel aktivite yüksek molekül ağırlıklı (L) kitosan jeline gözlenmiştir. Düşük (S) ve orta molekül ağırlıklı (M) kitosan jeller ise benzer etkiyi göstermektedir. Orta molekül ağırlıklı Sig formülasyonu M'den daha etkili bulunmuştur. Formülasyonların tümü % 0.1'lik klorheksidin glukonat çözeltisinden daha düşük inhibitör etki göstermiştir.

Tablo 3.11’de kitosan jellerin *A. actinomycetemcomitans* için broth makrodilüsyon testi ile elde edilen MİK sonuçları verilmiştir.

**Tablo 3.11.** Kitosan jellerin *A. actinomycetemcomitans* için MİK değerleri (n=2)

Formülasyon	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
	MİK (mg/mL)
S	>30
M	20
L	5
Sig	10
P	3.75

Düşük molekül ağırlıklı (S) baz kitosanının minimum inhibitör konsantrasyonu 30 mg/mL’nin üzerinde bulunmuştur. Bu doğrultuda S formülasyonunun antibakteriyel etkisinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Orta molekül ağırlıklı (M/Sig) kitosanlar için sırasıyla 20 ve 10 mg/mL MİK değerleri elde edilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı (L) baz kitosanının MİK değeri 5 mg/mL, suda çözünen protasan klorür (P) içinse 3.75 mg/mL bulunmuştur. Tüm formülasyonlar içinde en düşük MİK değerini suda çözünen protasan klorür (P) formülasyonu göstermiştir. Jel formülasyonların *A. actinomycetemcomitans*’a karşı antibakteriyel etkinlikleri şu şekilde sıralanabilir: P > L > Sig > M > S şeklinde sıralama vermektedir. Artan molekül ağırlığı ile inhibitör etkinin arttığı görülmüştür.

*A. actinomycetemcomitans* için MBK değeri elde edilememiştir. Diğer bir deyişle formülasyonlar *A. actinomycetemcomitans* için öldürücü etki göstermemiştir.

TAC kortikosteroittir, antimikrobiyal etkisi bulunmamaktadır.

#### 4. TARTIŞMA

Bu bölümde tez çalışması süresince gerçekleştirilen tüm deneysel çalışmaların ve elde edilen bulguların genel bir değerlendirilmesi yapılarak sonuçlar literatür bilgileri ile karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.

Bu çalışmada; HIV enfeksiyonunda sık görülen oral lezyonların tedavisinde tek başına ya da diğer ilaçlar için taşıyıcı sistem olarak kullanılacak formülasyonların geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için biyoadeziv, biyouyumlu, biyoparçalanabilir özellikte bir polimer olmasının yanısıra, yara iyileştirici ve antimikrobiyal aktivite göstermesi nedeniyle kitosan seçilmiş olup jel şeklinde dozaj formları geliştirilmiştir.

Farklı kitosan çeşidi ve çözücü ortamı kullanılarak jel formülasyonları hazırlanmıştır. Bunun için değişik molekül ağırlığına, kaynağa ve çözünürlüğe sahip kitosanlar seçilmiştir. Çözücü olarak ise distile su veya dilüe laktik asit kullanılmıştır.

Jel şeklindeki formülasyonların uygulama kolaylığı ve ilacın lokal etkinliğinin artırılması gibi üstünlükleri bulunmaktadır. Ayrıca hasta uyuncu da oldukça yüksektir. Bukkal bölgeye uygulanacak adeziv dozaj şekli, yanak hareketlerini kısıtlamamak için yeterince esnek olmalıdır. İstenen süre boyunca mukozaya tutunmayı sağlamalı ancak mukozaya zarar vermemeli, irritasyona neden olmamalıdır. Mukoadeziv taşıyıcı sistem sayesinde de uygulama bölgesinde ilacın uzun süre kalışı ve uygulama sıklığının azaltılması mümkün olmaktadır.

Çalışmada etkin madde olarak seçilen triamsinolon asetonit ağız içindeki mukozal lezyonların topikal tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Türk ilaç piyasasında oral inflamatuvar ve ülseratif lezyonların semptomlarının giderilmesinde kullanılan Kenacort-A Orabase ağız pomadı mevcuttur. Kullanım konsantrasyonu % 0.1 olarak piyasa preparatı ve literatürden hareketle seçilmiştir (72-76).

TAC'ın asetonitril/su içinde hazırlanmış çözeltisinin 200-400 nm arasında spektrumu alındığında maksimum absorbans verdiği dalga boyu 240 nm bulunmuştur. Bu bulgu, literatürde verilen 238-254 nm aralığına uygundur (77).

### **Formülasyon geliştirme**

Yapılan ön çalışmalarda değişik kitosanlar arasında benzer bir viskozite aralığı sağlayacak ve topikal uygulama için uygun olacak şekilde jel konsantrasyonları seçilmiştir. Ön çalışmalar sonunda amacımıza uygun olarak kitosan konsantrasyonları; düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı baz kitosanlar için sırasıyla % 3, % 2 ve % 1 (a/h); suda çözünen ve baz protasan için % 3 (a/h) ve mantar kaynaklı kitosan için % 5 (a/h) olacak şekilde seçilmiştir.

Çalışmada kullanılan Protasan klorür UP CL 213 suda çözünürken; diğer kitosanların tümü baz olup (Chitopharm S/M/L, KiOmedine-CsU, Sigma kitosan ve Protasan UP B 80/20) asidik çözeltilerde çözünebilmektedir. Buna bağlı olarak jellerin hazırlanmasında distile su ve % 1 laktik asit olmak üzere iki farklı çözücü kullanılmıştır. Suda çözünen Protasan klorür UP CL 213 kullanılarak hazırlanan jelin pH değeri 4-5 arasındayken baz kitosan Protasan UP B 80/20 kullanılarak hazırlanan jelin pH'sı 5 civarında bulunmuştur. Kitosan ile hazırlanan jel formülasyonlarına TAC'ın eklenmesi ile pH değerlerinde hafif düşüş görülmüştür.

Baz kitosan/suda çözünen protasan klorürle hazırlanan jeller renksiz ve kokusuz iken, mantar kaynaklı kitosan (K) sarı renkte ve bitkisel kokuludur. Etkin maddenin disperse edilmesiyle formülasyonların kokusu değişmemiş; ancak beyaz renk almıştır.

Hazırlanan jellerde viskozite çalışmaları yapılmış olup tüm formülasyonların psödoplastik akış gösterdikleri bulunmuştur (Şekil 3.5 ve 3.6). Bu tip sistemler kayma hızı arttıkça viskozitesi azalan sistemlerdir. Pratikte hasta jeli yara yüzeyinde dağıtırken sistemin viskozitesi azalacak, böylece uygulama kolaylığı sağlanabilecektir. Ayrıca jelin tüpten alınması kolay olacaktır.

Etkin madde içeren ve içermeyen jeller kendi içerisinde karşılaştırıldığında viskozite değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Kitosan ile hazırlanan jellere TAC'ın eklenmesiyle orta (M/Sig) ve yüksek (L) molekül ağırlıklı baz kitosan ile suda çözünen protasan klorür (P) formülasyonlarının viskozitesinde artış gözlenirken ( $p < 0.05$ ); düşük molekül ağırlıklı baz kitosan (S), baz protasan (P-

B) ve mantar kaynaklı kitosan (K) formülasyonlarında fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Viskozite üzerine çözünürlüğün etkisi incelendiğinde, suda çözünen protasan klorür ile hazırlanan jelin viskozitesi laktik asit içinde hazırlanan baz protasanınkine yakın bulunmuştur.

Jel formülasyonların viskozite ölçümleri oda sıcaklığında, 25 °C’de, gerçekleştirilmiştir. Yarı-katı sistemlerin viskozitesinin artan sıcaklıkla azaldığı bilinmektedir. Dolayısıyla ağız içine uygulanacak bu sistemlerin viskozitesi vücut sıcaklığı olan 37 °C’de bir miktar azalacaktır.

Zeta potansiyel için pozitif değerler bulunmuştur. Bu; kitosanın amino gruplarının protonlanması böylece molekülün pozitif yüklenmesinden dolayıdır.

Etkin madde içeren ve içermeyen jeller kendi içerisinde karşılaştırıldığında zeta potansiyel değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kitosan ile hazırlanan jellere TAC’ın eklenmesiyle düşük (S) ve orta (M/Sig) molekül ağırlıklı baz kitosan ile mantar kaynaklı kitosan (K) formülasyonlarının zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir azalma gözlenirken ( $p<0.05$ ); yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan (L), suda çözünen protasan klorür (P) ve baz protasan (P-B) formülasyonlarında fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ) (Tablo 3.6).

Kolloidal sistemlerde ortaya çıkması olası sorunlar pH değişikliği, viskozite değişikliği, çökme, renk, koku ve tat değişmesi şeklinde olabilir. Sistemdeki yükün mevcudiyeti ve büyüklüğü formülasyonun stabilitesi açısından önemlidir. Elde edilen zeta potansiyel değerleri göz önüne alındığında hazırlanan formülasyonların fiziksel stabilitesini olumlu yönde etkileyeceği açıktır. Ayrıca zeta potansiyel, in vivo ortamda hücre membranıyla etkileşim açısından önemlidir. Mukoza yüzeyinin negatif olması nedeniyle pozitif yüklü jellerin kullanılması formülasyonun mukoza üzerinde kalış süresini uzatacağı için büyük bir üstünlük getirmektedir.

### **İn Vitro Salım**

Çalışmalarımızda Franz difüzyon hücreleri kullanılmıştır. Triamsinolon asetonitin çözünürlüğü düşük olduğu için salım ortamına yüzey etkin madde eklenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla % 1 SLS ve Cremophor EL denenmiş,



Cremophor EL ile daha iyi sonuç alındığı için deneylere bu yüzey etkin madde ile devam edilmiştir.

Yapılan salım çalışmalarında, kullanılan kitosan tipinin salım profilleri üzerine etkisi incelendiğinde, bütün formülasyon gruplarının salım profillerinin benzer olduğu görülmüştür ( $f_2 > 50$ ) (Şekil 3.10). 6 saat sonunda elde edilen veriler incelendiğinde, jellerin hazırlanmasında kullanılan farklı kitosanların çözünürlüğünün etkin maddenin salımı üzerine etkisinin olduğu, laktik asitte çözünen kitosanolardan salımın distile suda çözünene göre daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Salımda 30 dakikalık bir gecikme süresi görülmüştür. Bu sürenin salım ortamıyla jelin hidrate olması, etkin maddenin çözünmesi ve sonrasında moleküllerin membrandan geçiş sürecinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Suda çözünen protasan klorür formülasyonu (P 01) sırasıyla 2 ve 4 saat sonunda %  $4.9 \pm 0.1$  ve %  $14.8 \pm 0.9$ , baz kitosan formülasyonu (S 01) ise %  $5.5 \pm 0.3$  ve %  $16.6 \pm 0.5$  salım elde edilmiştir.

Piyasa preparatı Kenacort-A Orabase ile sırasıyla 2 ve 4 saat sonunda %  $4.8 \pm 0.21$  ve %  $12.2 \pm 0.48$  salım elde edilmiştir, 6 saat sonunda ise toplam salınan etkin madde miktarı %  $21.4 \pm 0.8$  olarak bulunmuştur. Kitosan jelleri ile piyasa preparatına göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

İlacın membrandan geçişi uygulanan formülasyonun özellikleri ile yakından ilgilidir. Etkin maddenin öncelikle verildiği formülasyondan salınması gerekmektedir. Daha sonra etkin madde membrana geçecektir. Kenacort-A ağız pomadı yağ bazlı bir formülasyondur. Suda çözünmeyen triamsinolon asetonitin sıvağa ilgisinin olması daha az geçişle sonuçlanabilir. Ayrıca Kenacort-A ağız pomadının viskozitesi de hazırlanan kitosan jellerinden yüksektir.

İn vitro salım değerlerine bakıldığında; etkin madde salımının düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun, etkin maddenin sudaki çözünürlüğünün düşük olmasından ileri geldiği düşünülmektedir.

### **Mukoadezyon**

Bukkal mukoadezif bir formülasyonun mukoza yüzeyi ile uzun süreli temas, ilacın patolojik bölgede salınması, sistemik uygulamayı önlemek gibi avantajları vardır. Mukoadezif jel formülasyonlarının önemi etkin maddenin temas bölgesindeki kalış süresini arttırarak lokal etkinliği geliştirmelerinden ileri gelir. Bu sayede bukkal mukoadezif sistemlerin özellikle oral mukozal lezyonlarda uygulanmasıyla çeşitli avantajlar sağlanabilir. Adezif olmayan sistemlerde ilacın tükürük içine salınarak yutma sonucu oral kaviteden uzaklaşması, ortamdaki ilaç konsantrasyonunun sürekli olarak seyrelerek azalması gibi dezavantajları vardır (10).

Bu çalışmada farklı özelliklere sahip kitosanlarla hazırlanmış jellerin mukoadezif özellikleri incelenmiştir. Öncelikle düşük (S), orta (M) ve yüksek (L) molekül ağırlıklı kitosanlar karşılaştırıldığında düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanın adezyon işi verilerinin yüksek molekül ağırlıklı kitosandan daha fazla olduğu yani mukoadezif özelliğinin daha iyi olduğu bulunmuştur. Düşük molekül ağırlıklı polimerin hareketliliği mukozayla etkileşimi arttırmaktadır. Molekül ağırlığının yanısıra kitosan jelin konsantrasyonu da adezyon üzerine etki etmektedir. Zira konsantrasyona göre hazırlanan jellerin viskozitesinin değiştiği bulunmuştur. 10 rpm'de elde edilen viskozite değerlerine bakıldığında yüksek molekül ağırlıklı (L) baz kitosan jelin viskozitesi  $1215.3 \pm 22.1 \text{cP}$ , düşük molekül ağırlıklı olanın (S) viskozitesi  $1464.0 \pm 10.0 \text{cP}$  ve orta molekül ağırlıklı olanın (M) viskozitesi  $1946.0 \pm 54.4 \text{cP}$  olarak bulunmuştur, yani yüksek molekül ağırlıklı jelin viskozitesi diğer iki formülasyona göre daha düşüktür, yüksek molekül ağırlıklı jelin daha zayıf mukoadezif özellik gösterme nedeni de bundan dolayıdır.

Kitosan tiplerinin adezif özellikleri karşılaştırıldığında aynı kaynaktan sağlanan suda çözünen protasan klorür (P) ile baz protasan (P-B) arasında adezif özellik bakımından önemli fark gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Elde edildiği kaynağa göre karşılaştırma yapıldığında, bitkisel (mantar) kaynaklı kitosanın hayvansal kaynaklı-orta molekül ağırlıklı baz kitosanla (M) benzer özellik gösterdiği bulunmuştur ( $p > 0.05$ ). Hayvansal kaynaklı baz kitosanlar arasında ise en iyi adezyonu orta molekül ağırlıklı (M) jel göstermiştir. Formülasyonlara etkin madde ilavesinin mukoadezif özelliği önemli olarak etkilemediği saptanmıştır ( $p > 0.05$ ).

Mukoadezyon çalışmalarında deney aşamasında öncelikle probun temas süresinin etkisi incelenmiş olup elde edilen mukoadezyon işi değerleri arasında etkin madde içeren-orta molekül ağırlıklı M 01 ve boş-yüksek molekül ağırlıklı baz kitosan (L) formülasyonu dışında (Şekil 3.15 ve 3.17) anlamlı fark bulunmamıştır. Yani M 01 ve L dışında temas süresinin artması jellerin mukoadezif özelliklerini etkilememiştir. Daha sonra etkin madde ilavesinin mukoadezif özellik üzerine etkisi incelenmiş ve istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Farklı temas sürelerinin mukoadezyon ölçümleri üzerine etkisi incelendiğinde, temas süresinin artmasıyla mukoadezif özelliğin artış gösterdiği grafiklerden gözlenmektedir, ancak bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Bunun nedeni örnek sayısının az olmasından kaynaklanmaktadır.

Bonferoni ve ark. (78) yaptıkları çalışmada kitosan ve laktik asitle hazırlanan mukoadezif vajinal jellerin özellikleri üzerine formülasyon parametrelerinin etkisini incelemiştir. Daha düşük molekül ağırlığına sahip kitosanın daha iyi mukoadezif özellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu durumu düşük molekül ağırlıklı polimerin yüksek mobilitesine ve interpenetrasyon özelliğine bağlamışlardır. Ayrıca çözücü olarak kullanılan laktik asit miktarının artmasıyla mukoadezif özelliğin azaldığını gözlemişlerdir. Bunun nedeni de müsin zincirlerindeki negatif yüklü siyalik asit gruplarının azalmış iyonizasyon dereceleridir.

İkinci ve ark. (49) yaptıkları çalışmada kitosanın molekül ağırlığı ve konsantrasyonundaki artışın viskozitede artışa neden olduğunu ancak çalışmada kullanılan değişik özellikteki kitosanların mukoadezyon kuvvetleri arasında belirgin fark gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Formülasyonların zeta potansiyel değerlerine bakıldığında, düşük zeta potansiyele sahip jelin daha yüksek mukoadezyon gösterdiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra yüksek pH'ya sahip formülasyonların yüksek mukoadezyon gösterdiği gözlenmiştir.

### **Antimikrobiyal Aktivite**

Pozitif yüklü kitosanın antimikrobiyal aktivitesi negatif yüklü mikroorganizma hücre duvarına bağlanarak hücrenin fonksiyonunu bozması esasına dayanmaktadır (79). Hücre içeriğinin dışarı sızması ve besin elementlerinin hücreye girişinin inhibe edilmesi, DNA ile bağlanması ve mRNA sentezini engelleyerek üremenin durdurulması gibi çeşitli teoriler ileri sürülmüştür (34). Kitosanın antimikrobiyal etkinliği molekül ağırlığı, asetilasyon derecesi, sıcaklık, pH gibi faktörlerden etkilenmektedir.

Bu çalışmada, değişik kitosan jellerin antimikrobiyal aktivitesi 2 farklı metotla test edilmiştir. Bu amaçla ağızda en fazla gözlenen patojenler seçilmiş olup formülasyonların antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. *P. gingivalis* ve *A. actinomycetemcomitans* ağız enfeksiyonlarından sıklıkla sorumlu olan periodontal patojenlerdir (80), HIV hastalarında sıklıkla görülmektedirler. *C. albicans* ise kandidiyazis gibi fırsatçı enfeksiyonlara neden olan bir mantar türüdür (70). İmmün sistemi baskılanmış hastalarda özellikle oral mukozada *C. albicans* enfeksiyonlarında artış dikkat çekmektedir.

Disk difüzyon testinde (Kirby-Bauer) diskin etrafında oluşan inhibisyon bölgesi ölçülmekte olup elde edilen çap ne kadar büyükse mikroorganizma ilaca o kadar duyarlı demektir (81). Dilüsyon testleri ise, bir antimikrobiyal ajanın mikroorganizma üremesini inhibe etmek veya mikroorganizmayı öldürmek için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanır.

Bu bölümde çalışmamızda hazırlanan formülasyonların seçilen patojenler üzerine etkisi gerek inhibisyon bölgesi çapı gerekse MİK-MFK/MBK değerleri göz önünde bulundurularak ayrı ayrı tartışılacaktır.

#### ➤ **C. albicans**

Çalışmamızda *Candida albicans* için ağız suyu ve standart suş denenmiştir; çünkü *C. albicans* ağız dışında vücutta birçok yerde florada bulunabilmekte ve bu maya mantar türünün standart olan ile ağızdan izole edilen bireye ait suş arasında yapısal (fenotipik/genotipik) bazı farklılıkları olup, virülans özellikleri (hastalık

yapma yeteneğinin derecesi) kişiden kişiye değişebilmektedir. Ayrıca insanların herhangi bir sebeple ilaç kullanmaları da bu suşların özelliklerinde değişiklik yapabilmektedir. Sadece standart suş üzerinde denemenin konakta kullanılması planlanan antimikrobiyallerin etkinliklerini etkileyebileceği olasılığını ortadan kaldırmak amacıyla ağız suşu da kullanılmıştır.

Disk difüzyon yöntemiyle elde edilen inhibisyon bölgesi çapı değerlerine göre; orta molekül ağırlıklı baz Sig kitosanın *Candida* ATCC kökenine ağız suşuna göre biraz daha etkili olduğu bununla beraber düşük (S) ve orta (M/Sig) molekül ağırlıklı baz kitosanın her iki fungal suşa aynı oranlarda etkili olduğu görülmüştür. Suda çözünen protasan klorürün (P) *Candida* suşları üzerine en etkili jel olduğu, yüksek molekül ağırlıklı baz kitosanın (L) P'ye göre daha az oranda olmak üzere fakat yine de yüksek etkili olduğu gözlenmiştir.

*Candida* standart ve izole ağız suşları üzerinde yapılan çalışmalarda, kitosan jellerin inhibisyon bölgesi çaplarına bakıldığında, düşük molekül ağırlıklı baz kitosanın (S) çapının (6-6 mm) orta molekül ağırlıklı olan M (6-6 mm) / Sig (6-8 mm) ile benzer bulunmasına karşın, MİK değeri 30 mg/mL'den büyük çıkmıştır. Bu da bize düşük molekül ağırlıklı baz kitosanın antifungal etkisinin olduğunu ancak denendiği konsantrasyondan daha yüksek değerlerde bu etkisinin anlamlı olacağını göstermektedir. MİK değerleri hesaplandığında; orta molekül ağırlıklı baz kitosana hazırlanan jellerin (M/Sig) uygulandığı konsantrasyonda her iki *Candida* suşuna karşı inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. Yüksek molekül ağırlıklı baz kitosana hazırlanan jel (L) için *C. albicans* standart ve ağız suşu üzerine inhibisyon bölgesi elde edilmesine karşın uygulandığı konsantrasyondan daha yüksek bir MİK değeri vermiştir. Bu da bize yüksek molekül ağırlıklı kitosanın antifungal etkisinin olduğunu ancak denendiği konsantrasyondan daha yüksek değerlerde bu etkisinin anlamlı olacağını göstermektedir. Suda çözünen protasan klorürle hazırlanan jellerin (P) uygulandığı konsantrasyonda her iki suş için inhibitör etki gösterdiği gözlenmiştir.

Test edilen konsantrasyonlarda kitosan jellerin fungisidal etki için yetersiz olduğu gözlenmiştir.

Seyfarth ve ark. (82) farklı *Candida* türlerine karşı düşük ve yüksek molekül ağırlıklı suda çözünür kitosanların etkisini nefelometre ile incelemişlerdir. Düşük molekül ağırlıklı kitosanın daha düşük antifungal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Palmeira-de-Oliveira (83) ve ark. yaptıkları çalışmada orta molekül ağırlıklı kitosan hidrojelin anti-kandidal etkisini incelemiş, *C. albicans* için 5 mg/mL'nin üzerinde bir MİK değeri elde etmiştir. Kitosan hidrojelini mukokütanöz kandidozis tedavisinde gelecek vaat eden bir taşıyıcı sistem olarak değerlendirmişlerdir.

Şenel ve ark. (57) *C. albicans*'a karşı klorheksidin içeren kitosan jel ve film formülasyonları hazırlamıştır. Formülasyonlardan salınan etkin madde miktarının MİK değerlerinin üzerinde olduğu saptanmıştır. % 0.1 Chx ve % 2 kitosan ile hazırlanan jel formunun oral kavitede kandidaya karşı etkili olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada *C. albicans*'a karşı % 2 kitosan jel için bulunan MİK değeri ( $10 \text{ mg/cm}^3$ ) bizim elde ettiğimiz değerlerle benzerdir.

#### ➤ *P. gingivalis*

Disk difüzyon yönteminden elde edilen bulgulara göre; düşük (S) ve orta (M/Sig) molekül ağırlıklı baz kitosanların birbirine benzer etki gösterdiği gözlenmiştir. Suda çözünen protasan klorür (P) ve yüksek molekül ağırlıklı baz kitosanın (L) *P. gingivalis* suşu için en etkili jel formları olduğu gözlenmiştir.

*P. gingivalis* suşu üzerinde yapılan çalışmalarda, kitosan jellerin inhibisyon bölgesi çaplarına bakıldığında, düşük molekül ağırlıklı baz kitosanın (S) çapının (6 mm) orta molekül ağırlıklı olan M (6 mm) / Sig (7 mm) ile benzer bulunmasına karşın, MİK değeri 30 mg/mL'den büyük çıkmıştır. Broth makrodilüsyon ile elde edilen MİK değerlerine göre; düşük molekül ağırlıklı baz kitosanla hazırlanan jeller (S) *P. gingivalis* suşu üzerine uygulandığı konsantrasyondan daha yüksek bir MİK değeri vermiştir. Bu da bize bu kitosanın antibakteriyel etkisinin olduğunu ancak denendiği konsantrasyondan daha yüksek değerlerde bu etkisinin anlamlı olacağını göstermektedir. Orta molekül ağırlıklı baz kitosanla hazırlanan jellerin (M/Sig) uygulandığı konsantrasyonda *P. gingivalis* suşu üzerine inhibitör etki yaptığı gözlenmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı baz kitosanla hazırlanan jellerin (L)

uygulandığı konsantrasyonda *P. gingivalis* suşu için inhibitör etki gösterdiği, suda çözünen protasan klorürle hazırlanan jellerin (P) uygulandığı konsantrasyondan oldukça düşük değerlerde bile inhibitör etki gösterdiği gözlenmiştir.

Broth makrodilüsyon ile elde edilen MİK değerlerine göre; molekül ağırlığındaki artışla birlikte kitosan jelin bakteriyostatik etkisi de artış gösterirken, disk difüzyon yönteminden elde edilen bulgularda düşük (S) ve orta (M) molekül ağırlıklı kitosanlar, yüksek (L) molekül ağırlıklı kitosandan daha küçük bir inhibisyon bölgesi vermekle beraber birbirleriyle aynı etkiyi göstermişlerdir.

Test edilen konsantrasyonlarda kitosan jellerin *P. gingivalis* üzerine öldürücü etkisi saptanmamıştır.

İkinci ve ark. (49) klorheksidin içeren kitosanın jel ve film formülasyonlarının periodontal patojen *P. gingivalis*'e karşı antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Kitosanın *P. gingivalis* üzerine etkili olduğunu ve yüksek molekül ağırlıklı kitosana bu etkinin arttığını göstermişlerdir. Bizim *P. gingivalis* için suda çözünen protasan klorür ile bulduğumuz inhibisyon bölgesi çapı değeri 3.75 mg/mL'dir, bu çalışmada da 5-10 mg/mL arası bir değer elde edilmiştir.

➤ ***A. actinomycetemcomitans***

Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen inhibisyon bölgesi çaplarına göre; düşük (S) ve orta (M/Sig) molekül ağırlıklı baz kitosanların birbirine benzer etki gösterdiği gözlenmiştir. Suda çözünen protasan klorür (P) ve yüksek molekül ağırlıklı baz kitosanın (L) *A. actinomycetemcomitans* suşu için en etkili jel formları olduğu gözlenmiştir.

*A. actinomycetemcomitans* suşu üzerinde yapılan çalışmalarda, kitosan jellerin inhibisyon bölgesi çaplarına bakıldığında, düşük molekül ağırlıklı baz kitosanın (S) çapının (6 mm) orta molekül ağırlıklı olan M ile aynı bulunmasına karşın, MİK değeri 30 mg/mL'den büyük çıkmıştır. Broth makrodilüsyon ile elde edilen MİK değerlerine göre; düşük molekül ağırlıklı baz kitosana hazırlanan jeller (S) *A. actinomycetemcomitans* suşu üzerine uygulandığı konsantrasyondan daha yüksek bir MİK değeri vermiştir. Bu da bize bu kitosanın antibakteriyel etkisinin

olduğunu ancak denendiği konsantrasyondan daha yüksek değerlerde bu etkisinin anlamlı olacağını göstermektedir. Orta molekül ağırlıklı baz kitosanla hazırlanan jellerin (M/Sig) uygulandığı konsantrasyonda *A. actinomycescomitans* suşu üzerine inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur. Yüksek molekül ağırlıklı baz kitosanla hazırlanan jellerin (L) uygulandığı konsantrasyonda *A. actinomycescomitans* suşu için inhibitör etki gösterdiği, suda çözünen protasan klorürle hazırlanan jellerin (P) *A. actinomycescomitans* suşu üzerine oldukça düşük konsantrasyonda bile inhibitör etki gösterdiği gözlenmiştir.

Broth makrodilüsyon ile elde edilen MİK değerlerine göre; molekül ağırlığındaki artışla birlikte kitosan jelin bakteriyostatik etkisi de artış gösterirken, disk difüzyon yönteminden elde edilen bulgularda düşük (S) ve orta (M) molekül ağırlıklı kitosanlar yüksek (L) molekül ağırlıklı kitosandan daha küçük bir inhibisyon bölgesi vermekle beraber birbirleriyle aynı etkiyi göstermişlerdir.

Test edilen konsantrasyonlarda kitosan jellerin *A. actinomycescomitans* üzerine öldürücü etkisi saptanmamıştır.

Choi ve ark (84) yaptıkları çalışmada, *A. actinomycescomitans* ve *S. mutans* üzerinde kitooligosakkaritlerin antibakteriyel etkisini incelemişlerdir. *A. actinomycescomitans*'in kitooligosakkaritle maruziyetinden sonra hücre zar yapısının bozulduğu gösterilmiştir.

Sarasam ve ark (85), iki farklı konfigürasyonda kitosan matriks hazırlayarak *S. mutans* ve *A. actinomycescomitans* üzerine antimikrobiyal etkisini değerlendirmiştir. Gözenek boyutu, PCL (polikaprolakton) ile karıştırma ve nötralizasyon işlemi gibi parametreleri incelemişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, suda çözünür kitosanın (P) daha yüksek inhibisyon bölgesi çapı gösterdiği için antimikrobiyal aktivitesi her üç mikroorganizma için de baz kitosanlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Baz kitosanlarda en fazla aktivite yüksek molekül ağırlıklı kitosanda (L) gözlenmiştir. Bu durumun nedeni kitosan formülasyonunun düşük viskozitede olması nedeniyle besiyerine daha iyi difüze olması ve daha iyi etki göstermesi olabilir.



Kenawy ve ark. (86) yaptıkları çalışmada modifiye kitosanların *C. albicans*, *A. flavus* ve *F. oxyporium* suşlarına karşı test edilen bakterilerden (*B.subtilis*, *E. coli* ve *S. aureus*) daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Peng ve ark. (87) hidroksipropil kitosanın *E. coli* ve *S. aureus*' a karşı etki göstermezken dört farklı meyve mantarına karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu disk difüzyon metoduyla göstermişlerdir.

Yüksek molekül ağırlığına sahip baz kitosan (L) ile hazırlanan jelin zeta potansiyel değeri diğer kitosanlara göre büyük, viskozitesi ise daha az bulunmuştur. Zeta potansiyel değerlerine bakıldığında daha düşük zeta potansiyel değerine sahip formülasyonun daha az antimikrobiyal aktivite gösterdiği, bunun yanı sıra yüksek pH'ya sahip formülasyonların yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Bakteri yüzeyi negatif yüklü olduğundan kitosandaki pozitif yük miktarı antibakteriyel etkide önemlidir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

1. Kullanılan kitosanın tipi ve özelliklerinin (elde edildiği kaynak, molekül ağırlığı, çözünürlük gibi) formülasyonun viskozite, salım, mukoadezif ve antimikrobiyal özelliklerini etkilediği gösterilmiştir.
2. Hazırlanan kitosan jel formülasyonlardan etkin madde için piyasa preparatına göre daha yüksek bir salım sağlanmıştır.
3. Kitosan jeller mukoadezif özellik göstermektedir. Bu sayede oral mukozaya uygulandığında daha uzun süre uygulama bölgesinde kalarak daha uzun süre ortama ilaç salımı sağlayacaktır. Böylece ilaçtan yararlanım artacaktır. Ayrıca viskoz özelliği nedeniyle okluzif özellik gösterecektir.
4. Kitosan jellerin HIV'de sıklıkla karşılaşılan bakterilerden olan *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ve bir mantar türü olan *Candida albicans* patojenleri üzerine antimikrobiyal aktivitesi gösterilmiştir.
5. Kitosanın kendisinin yara iyileştirici etkisi olması nedeniyle oluşan oral lezyonların iyileşmesini hızlandırması beklenmektedir.

### SONUÇ

Tüm bu bulgular ışığında çalışmada geliştirilen kitosan jel formülasyonları; etkin maddenin uzun süreli salımını sağlayan, mukoadezif özellikleri nedeniyle uygulama bölgesinde uzun süre kalan ve de antimikrobiyal, yara iyileştirici etkisi nedeniyle HIV enfeksiyonlarında gözlenen oral mukozal lezyonların tedavisinde umut vaat eden ilaç taşıyıcı sistemler olarak önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2007) Cellular and Molecular Immunology.
2. Petersen, P.E. (2006) Policy for Prevention of Oral Manifestations in HIV/AIDS: The Approach of the WHO Global Oral Health Program. *Adv Dent Res*, 19, 17-20.
3. Greenspan, D., Komaroff, E., Redford, M., Phelan, J.A., Navazesh, M., Alves, M.E.A.F. ve diğ erleri. (2000) Oral Mucosal Lesions and HIV Viral Load in the Women's Interagency HIV Study (WIHS). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 25 (1), 44-50.
4. Leao, J.C., Ribeiro, C.M., Carvalho, A.A., Frezzini, C., Porter, S. (2009) Oral complications of HIV disease. *Clinics (Sao Paulo)*, 64 (5), 459-470.
5. Coogan, M.M., Greenspan, J.,Challacombe, S.J. (2005) Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. *Bull World Health Organ*, 83 (9), 700-706.
6. Lee, J.W., Park, J.H.,Robinson, J.R. (2000) Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *J Pharm Sci*, 89 (7), 850-866.
7. Madhav, N.V.S., Shakya, A.K., Shakya, P., Singh, K. (2009) Orotransmucosal drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release*, 140 (1), 2-11.
8. Rossi, S., Sandri, G., Caramella, C.M. (2005) Buccal drug delivery: A challenge already won? *Drug Discovery Today: Technologies*, 2 (1), 59-65.
9. Pather, S.I., Rathbone, M.J., Ş enel, S. (2008) Current status and the future of buccal drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5 (5), 531-542.
10. Ş enel, S. (2010) Potential applications of chitosan in oral mucosal delivery. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 20 (1), 23-32.
11. Sankar, V., Hearnden, V., Hull, K., Juras, D.V., Greenberg, M.S., Kerr, A.R. ve diğ erleri. (2011) Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities. *Oral Diseases*, 17, 73-84.
12. Ş enel, S., Hıncal, A. (1995) Bukkal Mukoza ve İ laç Uygulamasındaki Yeri. *FABAD Farmasötik Bilimler Dergisi*, 20, 139-148.

13. İkinci, G., Şumnu, M., Şenel, S. (2001) Oral Kaviteye Uygulanan İlaç Taşıyıcı Sistemler. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 21 (2), 99-115.
14. Nicolazzo, J.A., Reed, B.L., Finnin, B.C. (2005) Buccal penetration enhancers- How do they really work? *Journal of Controlled Release*, 105 (1-2), 1-15.
15. Hearnden, V., Sankar, V., Hull, K., Juras, D.V., Greenberg, M., Kerr, A.R. ve diğerleri. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, In Press, Corrected Proof.
16. Şenel, S., Hıncal, A.A. (2001) Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *Journal of Controlled Release*, 72 (1-3), 133-144.
17. González-Moles, M.A., Scully, C. (2005) Vesiculo-erosive Oral Mucosal Disease Management with Topical Corticosteroids: (1) Fundamental Principles and Specific Agents Available. *Journal of Dental Research*, 84 (4), 294-301.
18. Baccaglini, L., Atkinson, J.C., Patton, L.L., Glick, M., Ficarra, G., Peterson, D.E. (2007) Management of oral lesions in HIV-positive patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 103 (Supplement 1), S50.e51-S50.e23.
19. Nunes, C., Escudier, M., Sanderson, J.D. (2007) Disorders of the mouth. *Medicine*, 35 (4), 189-193.
20. New York State Department of Health, A.I. (2001). Oral Health Care for People With HIV Infection, Ağ Sitesi: [http://www.aidsetc.org/pdf/guidelines/oral\\_guidelines.pdf](http://www.aidsetc.org/pdf/guidelines/oral_guidelines.pdf)
21. <http://www.vademecumonline.com.tr>. Ağ
22. The United States Pharmacopeia–National Formulary. (2007). [Elektronik Sürüm].
23. Loftsson, T., Hreinsdóttir, D. (2006) Determination of Aqueous Solubility by Heating and Equilibration: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, 7 (1), Article 4.
24. Martindale: ‘Martindale - the Extra Pharmacopoeia’ (29th edition bs.). (1989). London, England: The Pharmaceutical Press.
25. Irwin, C.R., McCullough, K.C., Jones, D.S. (2003) Chlorhexidine-containing mucoadhesive polymeric compacts designed for use in the oral cavity: an

- examination of their physical properties, in vitro/in vivo drug release properties and clinical acceptability. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14 (10), 825-832.
26. Andrews, G.P., Laverty, T.P., Jones, D.S. (2009) Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71 (3), 505-518.
  27. Sudhakar, Y., Kuotsu, K., Bandyopadhyay, A.K. (2006) Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs. *Journal of Controlled Release*, 114 (1), 15-40.
  28. Smart, J.D. (2005) The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (11), 1556-1568.
  29. Kharenko, E., Larionova, N., Demina, N. (2009) Mucoadhesive drug delivery systems (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 43 (4), 200-208.
  30. Salamat-Miller, N., Chittchang, M., Johnston, T.P. (2005) The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (11), 1666-1691.
  31. Percot, A., Viton, C., Domard, A. (2002) Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules*, 4 (1), 12-18.
  32. Chatelet, C., Damour, O., Domard, A. (2001) Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22 (3), 261-268.
  33. Illum, L. (1998) Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharmaceutical Research*, 15 (9), 1326-1331.
  34. Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G., Steurbaut, W. (2003) Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, 4 (6), 1457-1465.
  35. Ong, S.-Y., Wu, J., Moochhala, S.M., Tan, M.-H., Lu, J. (2008) Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*, 29 (32), 4323-4332.
  36. Moon-Moo, K., Se-Kwon, K. (2010). Anti-Inflammatory Activity of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives (s. 215-221): CRC Press

37. Chirkov, S.N. (2002) The Antiviral Activity of Chitosan (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38 (1), 1-8.
38. Muzzarelli, R.A.A. (2009) Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76 (2), 167-182.
39. Chen, C.-L., Wang, Y.-M., Liu, C.-F., Wang, J.-Y. (2008) The effect of water-soluble chitosan on macrophage activation and the attenuation of mite allergen-induced airway inflammation. *Biomaterials*, 29 (14), 2173-2182.
40. Şenel, S., Kremer, M.J., Kaş, S., Wertz, P.W., Hincal, A.A., Squier, C.A. (2000) Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. *Biomaterials*, 21 (20), 2067-2071.
41. Illum, L., Farraj, N.F., Davis, S.S. (1994) Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Peptide Drugs. *Pharmaceutical Research*, 11 (8), 1186-1189.
42. Thanou, M., Verhoef, J.C., Junginger, H.E. (2001) Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50 (Supplement 1), S91-S101.
43. Sandri, G., Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M.C., Muzzarelli, C., Caramella, C. (2004) Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21 (2-3), 351-359.
44. Onishi, H., Machida, Y. (1999) Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, 20 (2), 175-182.
45. Perioli, L., Ambrogi, V., Venezia, L., Pagano, C., Ricci, M., Rossi, C. (2008) Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66 (1), 141-145.
46. Bonferoni, M.C., Sandri, G., Rossi, S., Ferrari, F., Gibin, S., Caramella, C. (2008) Chitosan citrate as multifunctional polymer for vaginal delivery: Evaluation of penetration enhancement and peptidase inhibition properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33 (2), 166-176.
47. Gratieri, T., Gelfuso, G.M., de Freitas, O., Rocha, E.M., Lopez, R.F.V. (2011) Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79 (2), 320-327.

48. No, H.K., Young Park, N., Ho Lee, S., Meyers, S.P. (2002) Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74 (1-2), 65-72.
49. İkinci, G., Şenel, S., Akıncıbay, H., Kaş, S., Ercis, S., Wilson, C.G. ve diğerleri. (2002) Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Pharmaceutics*, 235 (1-2), 121-127.
50. Özmeriç, N., Özcan, G., Haytaç, C.M., Alaaddinoğlu, E.E., Sargon, M.F., Şenel, S. (2000) Chitosan film enriched with an antioxidant agent, taurine, in fenestration defects. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51 (3), 500-503.
51. Günbeyaz, M., Faraji, A., Özkul, A., Puralı, N., Şenel, S. (2010) Chitosan based delivery systems for mucosal immunization against bovine herpesvirus 1 (BHV-1). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41 (3-4), 531-545.
52. Okamoto, Y., Kawakami, K., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y., Minami, S. (2002) Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 49 (3), 249-252.
53. Fakhry, A., Schneider, G.B., Zaharias, R., Şenel, S. (2004) Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. *Biomaterials*, 25 (11), 2075-2079.
54. Boynueğri, D., Özcan, G., Şenel, S., Uç, D., Uraz, A., Ögüş, E. ve diğerleri. (2009) Clinical and radiographic evaluations of chitosan gel in periodontal intraosseous defects: A pilot study. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90B (1), 461-466.
55. Aksungur, P., Sungur, A., Ünal, S., Iskit, A.B., Squier, C.A., Şenel, S. (2004) Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. *Journal of Controlled Release*, 98 (2), 269-279.
56. Rossi, S., Marciello, M., Bonferoni, M.C., Ferrari, F., Sandri, G., Dacarro, C. ve diğerleri. (2010) Thermally sensitive gels based on chitosan derivatives for the treatment of oral mucositis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74 (2), 248-254.

57. Şenel, S., İkinci, G., Kaş, S., Yousefi-Rad, A., Sargon, M.F., Hincal, A.A. (2000) Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 193 (2), 197-203.
58. Ataç, M.S., Şenel, S., Eren, A., Kustimur, S., Güngör, N. (2005) Application of chitosan films in sulcoplasty operations. *Advances in Chitin Sciences*, 8, 270-274.
59. Khoo, C.G.L., Frantzich, S., Rosinski, A., Sjöström, M., Hoogstraate, J. (2003) Oral gingival delivery systems from chitosan blends with hydrophilic polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55 (1), 47-56.
60. Zhang, Y., Cheng, X., Wang, J., Wang, Y., Shi, B., Huang, C. ve diğerleri. (2006) Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-[beta]1 DNA for periodontal tissue engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344 (1), 362-369.
61. Oktay, E.Ö., Demiralp, B., Demiralp, B., Şenel, S., Cevdet Akman, A., Eratalay, K. ve diğerleri. (2010) Effects of Platelet-Rich Plasma and Chitosan Combination on Bone Regeneration in Experimental Rabbit Cranial Defects. *Journal of Oral Implantology*, 36 (3), 175-184.
62. Jeong Park, Y., Moo Lee, Y., Nae Park, S., Yoon Sheen, S., Pyoung Chung, C., Lee, S.J. (2000) Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, 21 (2), 153-159.
63. Quan, J.-S., Jiang, H.-L., Kim, E.-M., Jeong, H.-J., Choi, Y.-J., Guo, D.-D. ve diğerleri. (2008) pH-sensitive and mucoadhesive thiolated Eudragit-coated chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 359 (1-2), 205-210.
64. İkinci, G., Şenel, S., Tokgözoğlu, L., Wilson, C.G., Murat, Ş. (2006) Development and in vitro/in vivo evaluations of bioadhesive buccal tablets for nicotine replacement therapy. *Pharmazie*, 61 (3), 203-207.
65. Giunchedi, P., Juliano, C., Gavini, E., Cossu, M., Sorrenti, M. (2002) Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53 (2), 233-239.



66. Reller, L.B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J. (2009) Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49 (11), 1749-1755.
67. Uhland, F.C., Higgins, R. (2006) Evaluation of the susceptibility of *Aeromonas salmonicida* to oxytetracycline and tetracycline using antimicrobial disk diffusion and dilution susceptibility tests. *Aquaculture*, 257 (1-4), 111-117.
68. European Pharmacopoeia. (6th edition bs.): Council of Europe
69. Chattin, B.R., Ishihara, K., Okuda, K., Hirai, Y., Ishikawa, T. (1999) Specific microbial colonizations in the periodontal sites of HIV-infected subjects. *Microbiol Immunol*, 43 (9), 847-852.
70. Calderone, R.A., Fonzi, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9 (7), 327-335.
71. Ellepola, A.N.B., Samaranyake, L.P. (2001) Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Diseases*, 7 (1), 11-17.
72. Shin, S.-C., Bum, J.-P., Choi, J.-S. (2000) Enhanced bioavailability by buccal administration of triamcinolone acetonide from the bioadhesive gels in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, 209 (1-2), 37-43.
73. Shin, S.-C., Kim, J.-Y. (2000) Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the buccal mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (2), 217-220.
74. Ungphaiboon, S., Maitani, Y. (2001) In vitro permeation studies of triamcinolone acetonide mouthwashes. *International Journal of Pharmaceutics*, 220 (1-2), 111-117.
75. Ahn, J.-S., Choi, H.-K., Chun, M.-K., Ryu, J.-M., Jung, J.-H., Kim, Y.-U. ve diğeri. (2002) Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly(acrylic acid) in vitro. *Biomaterials*, 23 (6), 1411-1416.
76. Nicolazzo, J.A., Reed, B.L., Finnin, B.C. (2005) Enhancing the buccal mucosal uptake and retention of triamcinolone acetonide. *Journal of Controlled Release*, 105 (3), 240-248.
77. Görög, S. (2004) Recent Advances in the Analysis of Steroid Hormones and Related Drugs. *Analytical Sciences*, 20 (5), 767-782.

78. Bonferoni, M., Giunchedi, P., Scalia, S., Rossi, S., Sandri, G., Caramella, C. (2006) Chitosan gels for the vaginal delivery of lactic acid: Relevance of formulation parameters to mucoadhesion and release mechanisms. *AAPS PharmSciTech*, 7 (4), E141-E147.
79. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010) Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (1), 51-63.
80. Gendron, R., Grenier, D., Maheu-Robert, L.-F. (2000) The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes and Infection*, 2 (8), 897-906.
81. Kronvall, G., Giske, C.G., Kahlmeter, G. Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion. *International Journal of Antimicrobial Agents*, In Press, Corrected Proof.
82. Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P., Hipler, U.C. (2008) Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-d-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *International Journal of Pharmaceutics*, 353 (1-2), 139-148.
83. Palmeira-de-Oliveira, A., Ribeiro, M.P., Palmeira-de-Oliveira, R., Gaspar, C., Costa-de-Oliveira, S., Correia, I.J. ve diğerleri. (2010) Anti-Candida Activity of a Chitosan Hydrogel: Mechanism of Action and Cytotoxicity Profile. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 70 (4), 322-327.
84. Choi, B.-K., Kim, K.-Y., Yoo, Y.-J., Oh, S.-J., Choi, J.-H., Kim, C.-Y. (2001) In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18 (6), 553-557.
85. Sarasam, A., Brown, P., Khajotia, S., Dmytryk, J., Madihally, S. (2008) Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19 (3), 1083-1090.
86. Kenawy, E.-R., Abdel-Hay, F.I., El-Magd, A.A., Mahmoud, Y. (2005) Biologically Active Polymers: Modification and Anti-microbial Activity of

Chitosan Derivatives. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 20 (1), 95-111.

87. Peng, Y., Han, B., Liu, W., Xu, X. (2005) Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan. *Carbohydrate Research*, 340 (11), 1846-1851.