



**KİTOSAN MİKROSÜNGER FORMÜLASYONU
HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Nur İlge ÇİNAR

Eskişehir, 2019

**KİTOSAN MİKROSÜNGER FORMÜLASYONU HAZIRLANMASI
VE *İN-VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nur İlge ÇİNAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ

Eskişehir

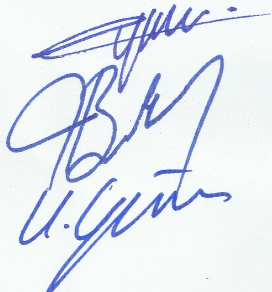
Anadolu Üniversitesi

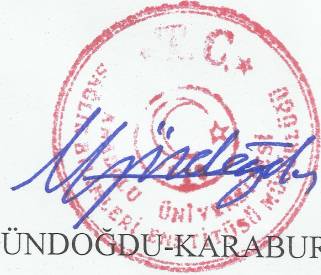
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz, 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nur İlge Çinar'ın "Kitosan Mikrosünger Formülasyonu Hazırlanması ve *İn-Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 30/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı-Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç.Dr.Evrım YENİLMEZ	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Umay Merve GÜVEN	



Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

KİTOSAN MİKROSÜNGER FORMÜLASYONU HAZIRLANMASI VE *İN-VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Nur İlge Çinar

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Evrim Yenilmez

Bu tez çalışmasının amacı, kitosan mikrosünger sisteminin hazırlanması, analjezik ve antienflamatuar olarak kullanılan etkin madde Benzidamin HCl'nin ilaç taşıyıcı sisteme eklenmesi, kontrollü salım gösteren yeni bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi ve sistemin *in vitro* salım çalışmalarının yapılmasıdır.

Benzidamin HCl ağız boşluğu, yumuşak doku ve derinin enflamatuar koşullarının tedavisi için yaygın olarak kullanılan bir etkin maddedir. Analjezik, antienflamatuar, antipiretik ve antimikrobiyal özelliklere sahip nonsteroidal bir ajandır.

Bu çalışmada, Benzidamin HCl içeren kitosan mikrosünger sistemi geliştirilmiştir. Formülasyonun karakterizasyonu için X-ışını kırınımı (XRD), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), infrared (IR), yüzey morfolojisi (SEM), şişme indisi ve yüzey pH ölçüm analizleri yapılmıştır. Salım profili ve salım kinetiği incelenmiş ve formülasyonun kararlılık çalışması yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Benzidamin HCl, Kitosan Mikrosünger, Antienflamatuar, Sürekli Salım



ABSTRACT

PREPARATION and *IN VITRO* EVALUATION of CHITOSAN MICROSPONGE FORMULATIONS

Nur İlge Çinar

ANADOLU UNIVERSITY INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCES

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

Supervisor:

Assoc. Prof. Dr. Evrim Yenilmez

The aim of this thesis study is to prepare chitosan microsp sponge system, to add the drug substance benzydamine hydrochloride which is used as analgesic and antiinflammatory to the drug delivery system, to improve a new drug delivery system which is showing controlled release and to do characterization of the system.

Benzydamine hydrochloride is commonly used drug substance for the treatment of inflammatory conditions of the oral cavity, soft tissue and skin. It is a nonsteroidal drug that possesses analgesic, antiinflammatory, antipyretic and antimicrobial propeties.

In this study, chitosan microsp sponge system containing benzydamine HCl was improved. For the characterization of the formulation, X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC), infrared (IR), surface morphology (SEM), swelling index and surface pH measurement analyzes were performed. Release profile and release kinetics were analyzed and stability study of the formulation was made.

Key Words: Benzydamine hydrochloride, Chitosan Microsp sponge, Anti-inflammatory, Sustained Release

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesinde, teorik bilgi birikiminden pratik uygulamalara dek bütün süreçlerde bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, bana büyük bir anlayışla yaklaşan, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sadece çalışmalarım boyunca değil tez çalışmalarımın dışında da benden yardımlarını, bilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım, Prof.Dr. Yasemin YAZAN'a, Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Doç.Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Doç.Dr. Ebru BAŞARAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDAŞ KIRIMLIOĞLU'na Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Alper ÖZTÜRK'e, Araş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen Araş.Gör. Kemal Can DEMİRKİLİNÇ ve Araş. Gör. Kadir AYKAÇ'a teşekkür ederim.


Beni bugünlere getiren ve hiçbir zaman yalnız bırakmayan, maddi manevi her türlü imkanı sağlayan, her koşulda yanımda olarak beni destekleyen ve yüreklendiren, anlayışlı ve fedakar annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca ilgisini ve anlayışını benden hiç esirgemeyen, bu zorlu sürecimde yanımda olarak bana her zaman büyük bir anlayışla destek ve yardımcı olan Kemal MUTLU'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli arkadaşlarım Ece KÜÇÜKERDEN, Seren AKCEYLAN ve Cansu ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Nur İlge CİNAR


İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ	xvi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Kitosan	2
2.1.1. KS fizikokimyasal özellikleri	3
2.1.2. KS toksisitesi	4
2.1.3. KS farmakokinetiği	4
2.1.4. KS farmakolojik özellikleri	5
2.1.4.1. Antimikrobiyal özellik	5
2.1.4.2. Yara iyileştirici özellik	6
2.1.4.3. Hemostatik aktivite	7
2.1.4.4. Analjezik etki	8
2.1.4.5. Kemik onarımı	8
2.1.5. KS'nin farklı dozaj şekilleri	9
2.1.5.1. Mikroküreler	9
2.1.5.2. Nanopartiküller	9
2.1.5.3. Lifler	10
2.1.5.4. Membranlar	11
2.1.5.5. Filmler	11
2.1.5.6. Hidrojeller	13
2.1.5.6.1. KS hidrojel çeşitleri	13

2.2. Kitosan Mikrosüngerler	15
2.2.1. KM'lerin üretimi	16
2.2.2. KM'lerin karakterizasyonu	17
2.2.2.1. <i>FT-IR</i>	17
2.2.2.2. <i>Termogravik analiz</i>	17
2.2.2.3. <i>Diferansiyel tarama kalorimetresi</i>	17
2.2.2.4. <i>Morfoloji</i>	18
2.2.2.5. <i>¹H-NMR (Nükleer manyetik rezonans)</i>	18
2.2.2.6. <i>X-ışını kırınımı</i>	18
2.2.2.7. <i>KM'lerin pH ölçümü</i>	18
2.2.2.8. <i>Şişme indeksi</i>	18
2.2.2.9. <i>Mekanik dayanıklılık</i>	19
2.2.2.10. <i>İlaç içeriğinin belirlenmesi</i>	19
2.2.2.11. <i>In vitro salım</i>	19
2.2.3. KM ile yapılan çalışmalar	20
2.3. Ağız ve Diş Yapısı	21
2.3.1. Dişin genel yapısı	21
2.3.2. Ağız mikroflorası	23
2.3.3. Diş çekimi	23
2.3.3.1. <i>Ağrı</i>	24
2.3.3.2. <i>Enflamasyon</i>	24
2.4. Benzidamin HCl	24
2.4.1. Fizikokimyasal özellikleri	25
2.4.2. Farmakolojik özellikleri	26
2.4.3. Farmakokinetik	26
2.4.4. Etki mekanizması	27
2.4.5. Endikasyonlar ve yan etkileri	28
2.4.6. Kullanım dozu	28
2.4.7. BNZ ile yapılan örnek çalışmalar	28
2.4.8. Piyasa preparatları	29
3. GEREÇLER	32
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.2. Kullanılan Cihazlar	32

4.YÖNTEMLER	34
4.1. Benzidamin HCl ve Yardımcı Maddeler ile Yapılan Çalışmalar	34
4.1.1. Termal analiz	34
4.1.2. X-ışını kırınımı	34
4.1.3. FT-IR	34
4.1.4. Parçacık şekli ve yüzey özellik	34
4.2. Benzidamin HCl Miktar Tayini İçin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	34
4.2.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışması	35
4.2.1.1. Doğrusallık	35
4.2.1.2. Kesinlik	35
4.2.1.3. Doğruluk	36
4.2.1.4. Duyarlılık	36
4.2.1.5. Seçicilik	37
4.3. KM'lerin Hazırlanması	37
4.3.1. PEG-Kitosan MS'lerin hazırlanması	37
4.3.2. TPP-Kitosan MS'lerin hazırlanması	38
4.3.3. NaOH-Kitosan MS'lerin hazırlanması	39
4.3.4. Glutaraldehit-Kitosan MS'lerin hazırlanması	40
4.4. KM Karakterizasyon Çalışmaları	41
4.4.1. Termal analiz	41
4.4.2. X-ışını kırınımı	41
4.4.3. FT-IR	41
4.4.4. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri	42
4.4.5. Formülasyonda etkin madde miktar tayini	42
4.4.6. <i>In vitro</i> salım çalışması	42
4.4.7. Şişme indisi tayini	42
4.4.8. Yüzey pH ölçümü	43
Kararlılık çalışması	43
Farmakokinetik salım çalışması	43
5. BULGULAR	44
5.1. Benzidamin HCl ve Yardımcı Maddeler ile Yapılan Çalışmalar	44
5.1.1. Termal analiz	44
5.1.2. X-ışını kırınımı	45

5.1.3. FT-IR	46
5.2. Benzidamin HCl Miktar Tayini İçin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	47
5.2.1. Doğrusallık	47
5.2.2. Keskinlik	48
5.2.3. Doğruluk	50
5.2.4. Duyarlılık	50
5.2.5. Seçicilik	51
5.3. MS Özelliklerine Ait Çalışma	52
5.3.1. Termal analiz	53
5.3.2. X-ışını kırınımı	54
5.3.3. FT-IR	55
5.3.4. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri	56
5.3.5. Formülasyonda etkin madde miktar tayini	56
5.3.6. <i>In vitro</i> salım çalışması	56
5.3.7. Şişme indisi tayini	57
5.3.8. Yüzey pH ölçümü	58
Kararlılık çalışması	58
Farmakokinetik salım çalışması	59
6. TARTIŞMA	63
6.1. Benzidamin HCl ve Yardımcı Maddeler ile Yapılan Çalışma	63
6.2. KM Formülasyonların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	64
6.3. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon	65
6.4. Kararlılık Çalışması	66
6.5. İK-1 Formülasyonununun <i>In Vitro</i> Salım Çalışması	67
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKÇA	70
ÖZGEÇMİŞ	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. KS spesifikasyonları	4
Çizelge 2.2. Benzidamin HCl'e ait bazı bilgiler	25
Çizelge 2.3. Benzidamin HCl içeren ticari preparatlar	30
Çizelge 4.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları	34
Çizelge 4.2. PEG-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı	38
Çizelge 4.3. PEG-Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	38
Çizelge 4.4. PEG- Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	38
Çizelge 4.5. TPP-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	39
Çizelge 4.6. TPP-Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	39
Çizelge 4.7. TPP-Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	39
Çizelge 4.8. NaOH-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	40
Çizelge 4.9. NaOH-Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	40
Çizelge 4.10. NaOH-Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	40
Çizelge 4.11. Glutaraldehit-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	41
Çizelge 4.12. Glutaraldehit-Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	41

Çizelge 4.13. Glutaraldehit-Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonlarının içerik oranı	41
Çizelge 5.1. Doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler ve alan değerler (n=3)	47
Çizelge 5.2. 100 µg.ml ⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları	48
Çizelge 5.3. 200 µg.ml ⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları	49
Çizelge 5.4. 300 µg.ml ⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları	49
Çizelge 5.5. BNZ'nin YBSK ile elde edilen doğruluk değerleri (n=3)	50
Çizelge 5.6. İK-1 formülasyonunda etkin madde miktarı (n=3)	56
Çizelge 5.7. İK-1 formülasyonunun şişme indisi (n=3)	57
Çizelge 5.8. İK-1 formülasyonunun yüzey pH değerleri (n=3)	57
Çizelge 5.9. Kararlılık çalışması etkin madde miktarı sonuçları (n=3)	58
Çizelge 5.10. Kararlılık çalışması şişme indisi sonuçları (n=3)	58
Çizelge 5.11. Kararlılık çalışması yüzey pH değeri sonuçları (n=3)	58
Çizelge 5.12. Farmakokinetik model bulguları	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. KS yapısı	2
Şekil 2.2. Kitosanın çeşitli biyomedikal uygulamaları	5
Şekil 2.3. Dişin yapısı	22
Şekil 2.4. Benzidamin HCl'nin 3D moleküler yapısı	25
Şekil 5.1. BNZ ve yardımcı maddelerin termogramı	44
Şekil 5.2. BNZ ve yardımcı maddelerin X-ışını kırınım profili	45
Şekil 5.3. BNZ ve yardımcı maddelere ait FT-IR spektrumu	46
Şekil 5.4. BNZ'nin yüksek basınçlı sıvı kromatografisine ait standart eğri ve doğrusallık eşitliği(n=3)	48
Şekil 5.5. BNZ'ye ait YBSK kromatogramı	51
Şekil 5.6. Mobil faza ait YBSK kromatogramı	51
Şekil 5.7. İK-Plasebo'ya ait YBSK kromatogramı	51
Şekil 5.8. Etkin maddeli/Maddesiz hazırlanan MS formülasyonlarının termogramı	53
Şekil 5.9. Etkin maddeli/maddesiz MS formülasyonunun X-ışını kırınım profili	54
Şekil 5.10. Etkin maddeli/maddesiz MS formülasyonunun FT-IR spektrumu	55
Şekil 5.11. İK-1 formülasyonuna ait <i>in vitro</i> salım profili	57

Şekil 5.12. İK-1 formülasyonunun ilk 6 saatine ait <i>in vitro</i> salım profili	57
Şekil 5.13. İK-1 formülasyonu için sıfırıncı derece kinetik modeli	59
Şekil 5.14. İK-1 formülasyonu için birinci derece kinetik modeli	60
Şekil 5.15. İK-1 formülasyonu için Higuchi modeli	60
Şekil 5.16. İK-1 formülasyonu için Korsmeyer-Peppas modeli	61
Şekil 5.17. İK-1 formülasyonu için Hixson-Crowell modeli	61
Şekil 5.18. İK-1 formülasyonu için Hopfenberg modeli	62
Şekil 5.19. İK-1 formülasyonu için Baker-Lonsdale modeli	62

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. Kitosan mikrosüngerlerin SEM görüntüleri	15
Görsel 5.1. PEG-Yüksek molekül ağırlıklı KM (İK-1)	52
Görsel 5.2. Etkin Maddeli ve etkin maddesiz hazırlanan KM formülasyonunun SEM görüntüsü	56



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
¹H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
AIC	Akaike Bilgi Kriteri
BNZ	Benzidamin HCl
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g	Gram
HPMC	Hidroksipropilmetil Selüloz
İK-1	1.Formülasyon
İK-Plasebo	Etkin Maddesiz Formülasyon
k	Hız sabiti
kDa	Kilodalton
KM	Kitosan Mikrosünger
KS	Kitosan
LOD	Saptama Sınırı
LOQ	Miktar Tayin Sınırı
m	Eğim
mg	Miligram
ml	Mililitre
MS	Mikrosünger
nm	Nanometre
NSAİİ	Nonsteroidal Antienflamatuar İlaç
Pbs	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PEG	Polietilenglikol
PGA	Poliglikolik asit
R²	Determinasyon Katsayısı
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
TGA	Termogravimetrik Analiz
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TPP	Tripolifosfat
UV	Ultraviyole
XRD	X-ışını kırınımı
YBSK	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
α	Alfa



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlaç taşıyıcı sistemlerin karşılaştığı en büyük zorluklardan biri, etkin maddenin vücudun hedeflenen bölgesine dağılımında karşılaşılan zorluklardır. Bu nedenle ilaç teknolojisindeki araştırmacılar, etkin maddenin etkinliğinin artırılması ve hastanın uyuncunu geliştirmek amacıyla farklı kontrollü sistemler geliştirmek üzerine çalışmalar yürütmektedir.

Kitosan mikrosünger (KM) yapıları travma bölgesinde nemli ortam sağlayabilmesi ve yara iyileşmesini hızlandırması gibi özellikleri sebebiyle tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Antibiyotik, antienflamatuar özellikteki etkin maddelerin kolaylıkla yüklenebildiği kitosan mikrosüngerler farklı materyallerle karıştırılma, türevlendirme gibi modifikasyonlar ile hedeflenen dokuya uygun hale getirilebilir.

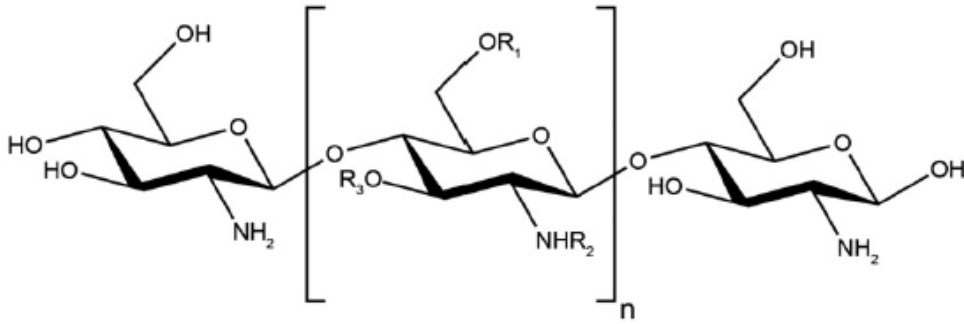
Benzidamin HCl (BNZ) nonsteroidal antienflamatuar ilaç (NSAİİ) grubunda bulunan antienflamatuar ve analjezik etkili ilaç etkin maddesidir. Sprey ve gargara formunda larenjit, tonsillit gibi enflamasyonlara bağlı ağrı tedavisinde tercih edilir. Ayrıca aft, gingivitis, diş çekimi gibi komplikasyonların tedavisinde kullanılır. Piyasada bulunan BNZ preparatları genellikle gargara şeklindedir. Ancak tükürük sıvısı ile seyrelmesi ve ağız boşluğu pH değerinde tamponlanmaması sebebiyle meydana gelen pH değişikliği sonucu etkisini uzun süre gösterememektedir ve etkili tedavi için günlük üç doz uygulama hasta uyuncunun düşmesine sebep olabilmektedir.

Yapılan çalışmada diş çekimi sonrasında meydana gelen travma bölgesinde ağrıyı azaltmak, enflamasyonu ortadan kaldırmak ve iyileşmeyi hızlandırmak amacıyla BNZ yüklü KM'ler hazırlanmıştır. Çalışmada seçilen formülasyonların geliştirilmesi, karakterizasyonu, *in vitro* salım çalışması ve kararlılık çalışması yapılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kitosan

Kitosan (KS) yengeç, karides vb. dış iskeletinde doğal olarak bulunan ve kitinin deasetilasyonu ile ticari olarak da üretilen bir polisakkarittir. Farklı molekül ağırlıklarına sahip olan, β -(1 \rightarrow 4) bağlı D-glikozamin ve N-asetil-D-glikozamin monomerleriyle karakterize olan bir polisakkarittir (Şekil 2.1.) (Bansal, vd., 2011, s.29). Yapısında bulunan reaktif amino grupları ile doğal olarak katyonik olan tek polimerdir ve birçok ticari uygulamaya sahiptir. Yara iyileşmesini hızlandırır, antimikrobiyal, antikoagulan, antibakteriyel, antifungal, antitümör ve hemostatik özellik göstermektedir (Hamedi vd., 2018, s. 446). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından KS ve klorür tuz formu güvenli olarak kabul edilmiş ve Avrupa Farmakopesi'nde monografi tanımlanmıştır (Perinelli vd., 2018, s.8).



Şekil 2.1. KS yapısı (Muanprasat ve Chatsudthipong, 2017, s.81).

KS 1859 yılında Roget tarafından keşfedilmiş ve adlandırılmıştır. Alkali koşullar altında kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilebildiği gibi yüksek sıcaklıklarda alkali işlem dışında enzimatik olarak da üretilebilmektedir. Bunun dışında KS belirli grup mantar hücrelerinin duvarlarında da bulunur. Özellikle *Zygomycetus* mantarlarının hücre duvarı yüksek miktarda KS içerir. Mantarlar yetiştirilirken fermantasyon parametrelerinin değiştirilmesi ile farklı molekül ağırlığına sahip KS'ler üretilebilir. Yengeç kabuğundan üretilen KS ile mantar hücre duvarlarından elde edilen KS karşılaştırılığında mantar KS daha düşük derecede asetilasyon, viskozite ve moleküler ağırlığa sahip olduğu gözlenmiştir (Hamedi vd., 2018, s. 447).

2.1.1. KS fizikokimyasal özellikleri

KS'lerin fiziksel özellikleri, değişen molekül ağırlığına, amino ve asetamido gruplarının dizisine ve saflığına bağlıdır. İstenen özellik ve çözünürlük dahil olmak üzere farklı biyolojik fonksiyonları sağlamak için modifiye edilebilen amino gruplarının varlığı sayesinde oldukça yaygın kullanım alanına sahiptirler. Amino grupları dışında sahip oldukları iki hidroksil grubunda gerçekleştirilen modifikasyonlarla çözünürlükleri artırılabilir (Pillai, Paul ve Sharma, 2009, s.644). Asidik koşullarda -NH₂ gruplarının protonlanmasına bağlı çözünürlüğü artarken, nötr ve bazik ortamda zor çözünür (Ahsana, vd., 2018, s.99). KS birincil amino grupları sebebiyle %50 ve daha yüksek deasetilasyon derecesinde pKa değeri 6.3 olan seyreltik sulu asit ortamlarında çözünür. Tekrarlayan D-glukozamin biriminin -NH₂ gruplarının protonlanması ile çözünme gerçekleşir. KS'nin moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesi çözünürlüğü üzerinde etkilidir. Molekül ağırlığının azalması ile KS'nin çözünürlüğünde artış gözlenir. Ayrıca küçük kimyasal yapıların KS modifikasyonu ile çözünürlük etkili bir biçimde artırılabilir (Hamedî vd., 2018, s. 447). Biyolojik olarak parçalanabilir olan KS'nin, %50 ile %100 arasında değişebilen deasetilasyon derecesinden birçok özelliği etkilenir. Deasetilasyon derecesi arttıkça degradasyon oranı azalır, büyüme oranları ve mekanik güç artar. Ayrıca molekül ağırlığı da bu özellikleri etkileyebilir. Deasetilasyon ve molekül ağırlığı sayesinde bozunma hızının kontrol edilebilmesi, hızlı veya daha yavaş bir şekilde tedavi etmek için uyarlanabilmelerini sağlar (Berretta, Bumgardner ve Jennings, 2017, s.239) .

Yüksek molekül ağırlıklı KS düşük molekül ağırlıklı olanlarda daha yüksek viskoziteye sahip çözeltiler oluşturur. Yüksek molekül ağırlıklı KS'lerin hidrolizinden sonra, düşük molekül ağırlıklı KS ve kitooligosakkaritlerin meydana gelmesi pek çok avantaj sunmaktadır. Meydana gelen bu yapılar, farklı molekül ağırlıklı kitosanların hazırlanması sırasında, viskozite ve moleküler ağırlığı belirlemek için bir parametre olarak kullanılırlar. Ayrıca yüzeylerinde negatif yüke sahip olan yüzeylere güçlü bir şekilde bağlanmalarını sağlayan pozitif yüklere sahiptirler ve bu durum biyolojik aktivitelerinin çoğundan sorumludur. Her özel tip biyoaktif KS, potansiyel farmasötik ve tıbbi uygulamaları için kimyasal modifikasyon ve enzimatik hidroliz ile geliştirilmiştir (Zhang, vd., 2010, s.1964).

Çizelge 2.1. *KS spesifikasyonları (Bansal, vd., 2011, s.31)*

Parametreler	Tanım	Yöntem
Görünüş	Beyaz veya sarı toz	Dış görünüş değerlendirmesi
Partikül boyutu	<30 µm	Optik mikroskop
Yoğunluk	1,35-1,40 g.cm ⁻³	Densitometre
Molekül ağırlığı	50.000-2.000.000 Da	HPLC
Asetilasyon oranı	% 66-99,8	FT-IR

2.1.2. KS toksisitesi

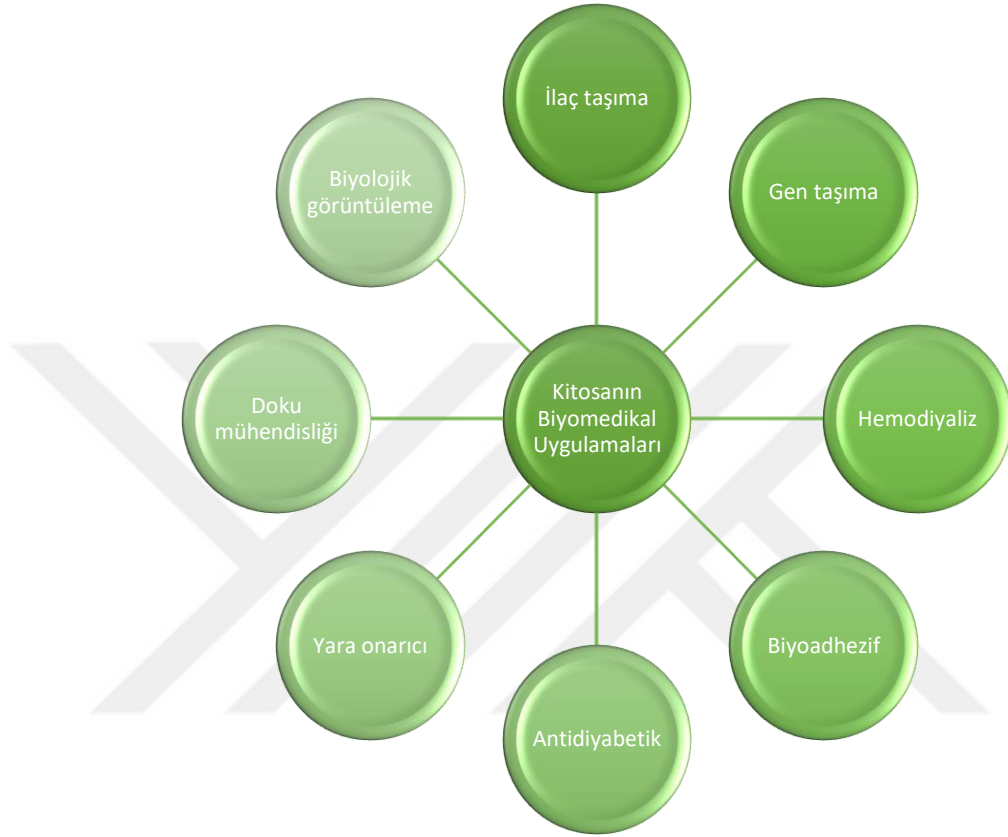
Yapılan çalışmalar sonucunda KS toksisitesinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu gösterilmiştir. Riberio ve ark. yaptığı çalışmada sıçan derisinden elde edilen dermal fibroblastlar ile test edilen KS hidrojellerinin *in vitro* sitotoksitesi incelenmiş ve hidrojel ve yıkım ürünlerinin sitotoksik olmadığı bulunmuştur. İnsan çalışmalarından elde edilen verilerin kısıtlı olmasına rağmen, Gades ve ark. yaptığı çalışmada KS'nin günlük olarak 4,5 g alımında toksik bir etki gözlenmediği bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada KS gargarası çalışmada kullanılan ticari gargara ile karşılaştırıldığında daha düşük toksisite ve daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. Patojenler bakterileri tamamen inhibe edebilmesine ek olarak doğal oral mikrofloranın canlılığında etkili düşümlere neden olmamıştır. Ayrıca KS'nin parenteral olarak ilaç eksipiyani olarak kullanılabilmesi öngörülmektedir. Ancak mevcut veriler tam olarak güvenli kullanıma sahip olduğuna dair yeterli değildir (Hamedi vd., 2018, s. 447).

2.1.3. KS farmakokinetiği

KS farmakokinetiğine bakıldığında, *in vitro* bozunmasının esas olarak enzimler aracılığıyla gerçekleşen depolimerizasyon yöntemi ile meydana geldiği görülmüştür. Bozunma KS'lerin deasetilasyon derecesine bağlıdır. Yüksek oranda deasetil içeren formların daha düşük oranda bozunmaya uğradığı görülmüştür. Biyobozunur özellikte olan KS idrarla kolaylıkla vücuttan uzaklaştırılabilir ve vücutta birikir. Farklı molekül ağırlıklarına sahip olan KS polimerlerinde molekül ağırlığı arttıkça vücutta emilimde azalma olur. Oral yolla verilen KS, bağırsaklarda bulunan enzimler ile büyük ölçüde sindirilir (Baldrick, 2010, s.292). KS degradasyon ürünleri, toksik olmayan, yavaş emilen ve vücut tarafından metabolize edilen glukozaminler ve oligosakkaritlerdir (Berretta, Bumgardner ve Jennings, 2017, s.240).

2.1.4. KS farmakolojik özellikleri

KS biyolojik olarak parçalanabilir, uyumlu olması ve toksik olmaması sebebiyle tıbbi ve farmasötik alanda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca yara iyileşmesi, hemostatik, analjezik ve antimikrobiyal özellik göstermektedir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Kitosanın çeşitli biyomedikal uygulamaları (Ahmed, S. ve Ikram,S., 2016, s.30)

2.1.4.1. Antimikrobiyal özellik

KS bakteri, mantar ve virüs gibi farklı mikroorganizmalara karşı etkili bir antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Antibakteriyel etki temel olarak KS'nin moleküler ağırlığına ve konsantrasyonuna bağlıdır. Daha düşük molekül ağırlığına sahip olan KS türevleri daha güçlü antibakteriyel etki gösterir (Bano vd., 2017, s.381).

KS'nin antibakteriyel etkisini değiştiren dört ana faktör bulunmaktadır (Kmiec vd., 2017, s.2). Bunlar;

- Mikrobiyal faktörler (Mikrobiyal türler ve hücrenin yaşı)
- KS'nin fizikokimyasal özellikleri (Pozitif yük yoğunluğu, hidrofilik ve hidrofobik özellikler, şelasyon kapasitesi)

- Fiziksel hal faktörleri (Katı hal ve çözünürlük)
- Çevresel faktörler (pH, iyon kuvveti, sıcaklık, zaman)

Katyonik özellik gösteren KS sıcaklık, pH ve elektrik alanlar gibi faktörlere göre yanıt verme yeteneğine sahiptir. Antimikrobiyal aktivitenin temelinde iki farklı mekanizma önerilmiştir. İlk mekanizma hücre yüzeyinde bulunan anyonik gruplar ile KS polimer zincirleri üzerindeki katyonik grupların etkileşime girmesi ile etki gösterir. Yapılan farklı çalışmalarda KS üzerindeki $-NH_3$ şeklinde pozitif yükün artışı ile antimikrobiyal etkinin arttığı gözlenmiştir. İkinci mekanizma ise özellikle düşük molekül ağırlığına sahip KS'nin hücre çekirdeğine girerek RNA ve protein sentezini inhibe etmesine dayanır (Bano vd., 2017, s.381).

Diş hekimliğinde kullanılan antimikrobiyal ajanların sahip olması gereken biyofilm oluşumunu inhibe etme ve azaltma, etkinin zamanla sınırlı olmaması, ajanın mekanik, kimyasal yapılarının bozunmaması gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir. Aynı zaman sitotoksisite göstermemelidir. KS tüm bu özelliklere sahip olduğundan diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kmiec vd.,2017, s.2).

2.1.4.2. Yara iyileştirici özellik

Yaralanan dokunun bütünlüğünün eski haline gelmesi anlamına gelen yara iyileşmesi süreci pıhtılaşma, iltihaplanmayı da içeren karmaşık bir süreçtir. Yara sonrası meydana gelen skar oluşumu tıp bilimi için büyük bir zorluktur. Meydana gelen büyük izler tip I ve tip II kollajenlerin dengesiz aktivitesi sonucu oluşur (Bano vd., 2017, s.381).

Çeşitli formlarda yara örtüsü olarak kullanılan KS biyolojik olarak uyumlu ve biyobozunurdur. Ayrıca yara iyileşme sürecinin hızlanmasına katkıda bulunur. Pansuman malzemesi olarak kullanıldığında da doku yapıştırıcı özellik gösterir. Yara iyileşmesi sürecinde fibroblastların proliferasyonuna katkıda bulunur. KS monomerleri kolajenin düzenli bir şekilde birikmesine yardımcı olarak yara bölgesinde doğal hyalüronik asit sentezi seviyesini artırır. Cilt dokularının yenilenmesi için selülozik bir ortam sağlar ve anormal büyüme aktivitesini durdurmak için makrofaj aktivasyonunu sağlar (Bano vd., 2017, s.382).

Yapılan çalışmalarda KS'nin yara iyileşmesinin evreleri olan hemostaz, pıhtılaşma, enflamasyon, proliferatif göç ve onarım aşamalarının hepsinde etkili olduğu ortaya çıkmıştır (Kmiec vd.,2017, s.3).

2.1.4.3. Hemostatik aktivite

Kanamamanın durması ve kanın hasar görmüş damar içinde tutulmasını sağlayan hemostaz yara bakımının ilk basamağıdır. Günümüzde yaygın olarak KS kaynaklı hemostatik ajanlar kullanılmaktadır. Karboksilleme ve çapraz bağlama modifikasyonları ile hemostatik etkinin artması sağlanmaktadır. Antikoagülan etkinlik alyuvarların negatif yüke sahip membranları ile KS'nin amino grupları arasında gerçekleşen bağ sonucu meydana gelmektedir (Bano vd., 2017, s.382).

KS nanoliflerinin gözenekli yapısının artması ile kanın pıhtılaşma derecesinde de artış gözlenir. Ayrıca KS'nin konsantrasyonu ve deasetilasyon derecesi de hemostaz derecesini etkileyebilir. Yapılan çalışmalarda katı haldeki yüksek deasetilasyon derecesine sahip olan KS daha fazla sayıda trombosit sınırladığı ve daha fazla hemostatik etki gösterdiği belirlenmiştir. Konsantrasyon ise kanamayı durdurma süresini etkileyebilir. Molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesinde çeşitlilik sayesinde KS ideal yara örtüsü için modifiye edilebilir. Ancak KS bazlı hemostatik yara örtü imalatı genellikle pahalıdır (Bano vd., 2017, s.382).

Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin genellikle inert özellikte olmasına karşın, yapılan çalışmalar ile KS yara iyileşmesi üzerinde biyolojik olarak aktif olduğu görülmüştür. Kanla yapılan *in vitro* çalışmalarda klasik koagülasyon zincirinden bağımsız olarak eritrositler ve KS arasında etkileşim meydana gelmiş ve pıhtılaşma faktörler veya trombositlerin yokluğunda pıhtı oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca makrofajların aktive edildiği ve hücre proliferasyonunun uyarıldığı yara modelleri kullanılarak kanıtlarla gösterilmiştir. Hemostatik özellikleri dışında, pozitif yüke sahip olan KS'nin serbest yağ asitlerine ve safra tuzu bileşenlerine bağlanması ile bağırsak emiliminin önüne geçmesi sayesinde kolesterol düşürücü ajan olarak kullanılabilceği öne sürülmüştür (Baldrick, 2010, s.292).

Cerrahi işlemler içeren diş tedavisi sırasında meydana gelen kanamayı ve tedavi sonrasında yara iyileşmesini kontrol etmek için en sık başvurulan yöntem hemostatik ajan kullanımınıdır. KS'nin yara iyileşmesi ve hemostaz üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada liyofilize KS kullanılmıştır. Kullanılan hemostatik yara örtüsü, yara yüzeyinde fiziksel bariyer oluşturarak ağrı ve iyileşme sürecini azaltmıştır (Kmiec vd.,2017, s.3).

2.1.4.4. Analjezik etki

Biyomedikal alanında geniş uygulama alanı bulunan KS, enflamatuvar ağrı üzerinden analjezik etki göstermektedir. Yapılan çalışmalarda kitin ve KS'nin analjezik etkisi ortaya konmuştur ancak KS'nin polikasyonik yapısı sebebiyle analjezik olarak kitinden daha fazla etkili olduğu öne sürülmüştür. KS aktivitesindeki fark enflamasyon alanında salınan proton iyonlarının KS tarafından emilimi sebebiyledir. Yapı üzerindeki serbest primer -NH₂ grupları enflamasyon alanın pH'sını düşürür. Ayrıca yapılan hayvan deneylerinde, yaraların KS ile kaplandığında hayvanların ağrı hissetmediği gözlenmiştir. KS'nin bradikinin emilimini sağlayarak analjezik etkiye sebep olduğu öngörülmüştür (Bano vd., 2017, s.383).

KS yapısında bulunan -NH₂ grupları sayesinde mide asidini nötralize edebilir ve midede koruyucu bir zar oluşturabilir. Asit hidrolizi ile oluşan glukozamin hidroklorür, sülfat, fosfat gibi tuzlar, bağ dokusunda kullanılan yapısal birimlerdir ve bu dokuların hasarında onarıcı veya rejenere edici olarak kullanılabilir. Bu etkileri dışında ayrıca yapılan çalışmalar ile KS polimerinin antioksidan ve antitümör etkinliği olduğu ortaya konulmuştur (Xia, vd., 2011, s.177).

Molekül ağırlığı 5 kDa olan kitooligosakkartiler, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç olan indometasinden daha iyi antiinflamatuvar etki gösterir. Prostaglandin E2 ve siklooksijenaz-2 protein ekspresyonunu inhibe ederek ve enflamasyonda etkili olan maddelerin miktarını azaltarak antiinflamatuvar etki gösterir. Ayrıca antiinflamatuvar madde olan interlökin-10 ekspresyonunu arttırarak etki gösterir (Ahmed,S. ve Ikram,S., 2016, s.30).

2.1.4.5. Kemik onarımı

Dişçilik ve ortopedi gibi alanlarda cerrahi tedavi yöntemlerin artması ile kemik onarımında etkili materyallerin geliştirilmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Geliştirilen materyaller cerrahi işlem sonrasında yara izleri ve ağrıyı azaltırken hastanın iyileşme sürecini hızlandırmalıdır. KS'nin biyobozunur ve biyoyumlu olması sayesinde sert dokuların tedavisi için uygun bir materyaldir. Doğal kemik dokusu tarafından iyileşme gerçekleştirilene kadar dokuda geçici iskele prensibi ile etki gösterir (Kmiec vd., 2017, s.3).

KS kemik rejenerasyonu ve iyileşmesi üzerinde yüksek etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalar sünger şeklindeki KS'nin kemik hücrelerini harekete geçirerek kemik yapımının arttırabileceğini göstermiştir. KS'nin diş çekimi sonrasında yara bölgesindeki etkilerini

gözlemlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, KS ile tedavi edilen bölgelerdeki kemik yoğunluğunun belirgin bir şekilde daha fazla olduğu belirlenmiştir (Kmiec vd., 2017, s.3).

2.1.5. KS'nin farklı dozaj şekilleri

2.1.5.1. Mikroküreler

Mikroküreler DNA, antijen ve enzimler için kontrollü veya sürekli salım gösteren ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilirler. KS mikroküreleri termal çapraz bağlama, kimyasal çapraz bağlama, tek emülsiyon tekniği ve çoklu emülsiyon teknikleri ile hazırlanabilir (Sah, Dewangan ve Suresh, 2019, s.188). KS geniş kullanım alanına sahip olan mikrokürelerin üretiminde de oldukça sık kullanılan bir polimerdir. Bu mikroküreler farklı avantajlar sunan optik ve fiziksel özelliklere sahiptir. KS yapıdaki mikroküreler, düşük pH değerinde püskürterek üretilebilir (Shukla vd., 2013, s.52). Hazırlanan mikrokürelerde ilaç salım oranı, polimer-etkin madde ve formülasyonda kullanılan çapraz bağlayıcı ile ilişkilidir (Ali ve Ahmed, 2018, s.274)

Yapılan bir çalışmada maksimum biyoyapışkanlık ve kontrollü ilaç salımı için tetrasiklin yüklü KS mikroküreleri sentezlenmiştir. Tripolifosfat kullanılarak hazırlanan mikrokürelerin salım kinetiği, antimikrobiyal aktivite, termal özellikler, yüzey morfolojisi ve yüzey pH'ı ile karakterize edilmiştir. Antimikrobiyal çalışmalarda *in vitro* salımda ilaç konsantrasyonunun *Staphylococcus aureus* inhibisyonu için gerekli olan minimum ilaç konsantrasyonunun üstünde olduğu görülmüştür. Termal analizlerde ilaç ve polimer arasında olası bir etkileşimi göstermiştir. Çalışma sonucu elde edilen biyoadhezyon, ilaç salımı ve fizikokimyasal karakterizasyon verileri mikroküre sisteminin lokal olarak peridontal tedavide etkili olduğunu göstermiştir (Sah, Dewangan ve Suresh, 2019, s.188)

2.1.5.2. Nanopartiküller

KS, kontrollü bir şekilde etkin madde salımına izin vermesi, etkinliği artırması, istenmeyen yan etkileri azaltması/ortadan kaldırması ve etkin madde konsantrasyonunu istenilen aralıkta sürekli tutulmasını sağlamak gibi avantajlar sunar (Muxika, vd., 2017, s.1361). Emülsiyon, çöktürme, iyonik jelyasyon vb. yöntemlerle hazırlanabilen KS nanopartikülleri, gastrointestinal kanalda kararsız olan ilaç moleküllerinin enzimatik bozunmasını önler. İlaç moleküllerinin etkinliği artarken aynı zamanda yapılan modifikasyonlar sayesinde etkin maddenin hedeflemesi yapılabilir (Ali ve Ahmed, 2018, s.275). Gen taşıyıcı olarak DNA'yı

koruyabilir ve genlerin ekspresyon süresini arttırabilir. Etkin madde ve gen taşıyıcı uygulamalar için geniş bir çalışma alanı sunmaktadır (Xia vd. 2011, s.176).

Peridontal hastalıklarda kullanıldığında nanopartiküller boyutları sayesinde diş etinde peridontal boşluk gibi alanlara nüfuz edebilir. Bu sayede ilaç uygulama sıklığı azalır ve etkin madde uzun süre boyunca homojen bir şekilde dağılım gösterir. Yapılan bir çalışmada KS iyonik jelyasyon yöntemi kullanılarak tripolifosfat anyonları ile nanopartikül üretilmiştir. KS nanopartiküllerinin ve bakır yüklü KS nanopartiküllerinin *E. coli*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde bu nanopartiküllerin bakteri üremesini inhibe edebildiği görülmüştür (Sah, Dewangan ve Suresh, 2019, s.190).

2.1.5.3. Lifler

İlk olarak 1926 gibi oldukça erken bir tarihte rapor edilen KS lifleri üretmenin birkaç yolu vardır. Lifler asetik asit çözeltisinden kuru ve ıslak eğirme yöntemi kullanılarak üretilebilir. Üretim maliyetini düşürmek ve lif özelliklerini geliştirmek için KS, sodyum alijinat, selüloz, sodyum hyalüronat, sodyum heparin, poliakrilik asit gibi farklı polimerler ile de karıştırılabilir.

KS lifleri yara pansumanlarında ve doku mühendisliğinde pek çok uygulama alanına sahiptir. KS asidik ortamda polielektrolit yapıda olduğundan elektrospinlenmesi zordur. Yapılan birkaç çalışmada saf KS lifleri bildirilmiştir. KS lifler trifloroasteik asit ve diklorometan karışımlarından üretilmiştir. KS yapısındaki amino gruplarının moleküller arasında etkileşimi bozan ve elektrospining işlemini kolaylaştıran tuzlar oluşturduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca diklorometan ile liflerin homojen oluşumu sağlanmıştır. Farklı çalışmalarda KS'nin elektrospinlenmesini kolaylaştırmak için heksanoil KS ve PEG'lenmiş KS gibi modifiye KS kullanımı bildirilmiştir (Oryan ve Sahvieh, 2017, s.1006, Croisier ve Jerome, 2013, s.788).

Peridontal kemiğin yenilenmesi gibi alanlarda uygulaması yapılabilen KS lifleri elektro eğirme yöntemi ile hazırlanmışlardır. Hazırlanan liflerin mekanik dayanıklılığını arttırmak için lifler metanol ile kurutulmuştur. Mekanik testler sonucu üretilen liflerin yeterli mekanik dirence sahip olduğu bulunmuştur. Üretilen lifler doku mühendisliğinde de kullanılmak için 3 boyutlu yapıda oluşturulabilir. Oluşturulan yapılar *in vitro* çalışmalarda hücre büyümesi için olanak sağlamıştır. İskele yüzeyinde büyüyen kemik hücreleri uygun morfoloji ve göstererek, KS

liflerinin kemik dokusu mühendisliğinde kullanım alanı bulabileceğini kanıtlamıştır (Sah, Dewangan ve Suresh, 2019, s.195).

Yapılan başka bir çalışmada gümüş içeren KS lifleri hazırlanmıştır. Gümüş iyonlarının salımı farklı ortamlarda incelenmiş iyonların iyon değişimi ve şelasyon ile etkinlik gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu iyonlar KS liflerinin antimikrobiyal özelliklerini önemli ölçüde arttırmıştır (Sah, Dewangan ve Suresh, 2019, s.195).

2.1.5.4. Membranlar

Çöktürmeli faz ayrışması yöntemi ile hazırlanan KS membranlar yara örtüsü olarak değerlendirildiğinde kontrollü buharlaşan su, yüksek oksijen geçirgenliği göstermiştir. Ayrıca KS'nin antimikrobiyal özelliği sayesinde mikroorganizma oluşumunu engellemiştir. Hazırlanan bu membran ile örtülen yara hemostatik özellik göstermiş ve yara iyileşmesini hızlandırmıştır. Epitel hücrelerinin oluşumunda meydana gelen artış ve dermiste gerçekleşen kollajen birikimi ile KS membranın yara sargı malzemesi olarak kullanılabilirliği öngörülmüştür (Jayakumar, vd., 2011, s.328).

Yapılan farklı bir çalışmada sentezlenen hidrofilik özellikli polimer membranlarının esneklik, gerilme gücü, geçirgenlik ve yüzey yapısı özellikleri farklı yöntemler ile değiştirilmiştir. Bu farklılıklar esnekliği artırıcı maddelerin eklenmesi, dialdehitler ile çapraz bağların oluşturulması gibi yöntemlerle sağlanmıştır (Jayakumar, vd., 2011, s.328).

2.1.5.5. Filmler

Filmler, etkin maddelerin polimerde dağıtıldığı ve etkin madde salınmasının ilaç difüzyonu ve/veya matris çözünmesi veya erozyonu ile meydana geldiği sistemlerdir. Filmlerin boyutları ve şekli uygulama alanına göre kolaylıkla kontrol edilebilir. İlacı tek başına difüzyon ile serbest bırakan filmler suda çözünmeyen polimerler ile üretilirken ilacı difüzyon ve matris erozyonu veya çözünmesi ile serbest bırakan filmler biyolojik olarak çözünebilen polimerler ile üretilir (Sah, Dewangan ve Suresh, 2019, s.190).

KS film oluşturma özellikleri oldukça iyidir. Seyreltik asetik asit çözeltilerinde çözüldüğünde amino grupları protonlanır ve asetat iyonları ile birleşir. Bu sayede DNA, glikozaminoglikanlar gibi negatif yüklü bileşikler yardımcı maddeler olmadan KS içine dahil edilebilir. KS'nin kontrollü salımlı implant sistemlerinin geliştirilmesindeki potansiyel kullanımı ilaç endüstrisinde kapsamlı şekilde araştırılmıştır. KS'nin film matrisi olarak kullanımı klorheksidin glukonat gibi hidrofilik yapıdaki ilaçların verilmesi için oldukça uygun

olduğu görülmüştür. Çünkü aynı çözücüde çözünen ilaç ve polimer ile homojen yapıdaki film matrisi üretimi oldukça kolaydır (Sah, Dewangan ve Suresh, 2019, s.190).

Kızılötesi veya fırınla kurutulan KS filmler KS'nin tuz çözeltilerinden ıslak döküm ile hazırlanırlar. Bağlantısız filmler ve KS ince filmler iki KS film formudur. KS filmleri CO₂ ve O₂ gibi gazlara geçirgenliği seçicidir ve su buharına karşı yüksek geçirgen yapıdadır (Oryan ve Sahvieh, 2017, s.1006).

Farklı konsantrasyonlarda döküm/çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan siprofloksasin yüklü PEG ile modifiye edilmiş KS filmleri hazırlanmıştır. Salınan siprofloksasin miktarı PEG oranındaki artışla artış göstermiştir ve filme yüklenmesi gereken etkin madde miktarı azalmıştır. Ayrıca etkin maddenin kümülatif salıverilme miktarı artış göstermiştir. FT-IR çalışmaları ile film matrisinde hidrojen bağı ve iyonik bağlarda artış olduğu öne sürülmüş ve bu durum KS ve PEG arasındaki moleküler uyuma bağlanmıştır (Sah, Dewangan ve Suresh, 2019, s.190).

KS film hazırlamak için farklı iki yöntem bulunmaktadır. Bunlar Langmuir Blodgett ve tabaka biriktirme teknikleridir. Bu iki farklı yöntemle KS filmin kalınlığı, içeriği, morfolojisi ve pürüzlülük gibi özellikleri kontrol edilebilir. Tabaka biriktirme tekniği, yüklü veya fonksiyonel grupları taşıyan malzemelerin sulu ortamda adsorpsiyonuna dayanır. Sentetik ve doğal polielektrolitler, nanotüpler ve biyomoleküller gibi çok sayıda molekül ile uygulanabilir. KS'nin polikationik yapıda olması yöntemin prosesleri için uygun olmasını sağlar. İlaç taşıyıcı sistemler, hemostatik sistemler, kemik implantları ve yara sargıları gibi pek çok alanda kullanılabilir (Croisier ve Jerome, 2013, s.788).

HemCon® bandajı, hemostatik özellikle olarak tasarlanan ve topikal bir antimikrobiyal yara örtüsü olarak incelenen KS asetat preparatıdır. Bu yara örtüsünün yaralar üzerindeki etkisi 1 saatten 9 güne kadar olan uygulamadan sonra yaralardan alındıktan sonra incelenmiştir. Üç günlük uygulama ile en erken yara kapanmasının sağlandığı ve tüm uygulama sürelerinde kontrol yaralarıyla karşılaştırıldığında daha hızlı iyileşme gösterdiği görülmüştür. 2. ve 4. günlerde yaradaki iltihap hücrelerinin sayısı azalmış ve antimikrobiyal etki sayesinde erken dönem yara iyileşmelerinde faydalı olduğu belirlenmiştir (Jayakumar, vd., 2011, s.328).

KS filmlerin özelliklerini geliştirmek için farklı işlemler uygulanır. Yüzey pürüzlülüğünü arttırmak ve hücre yapışması ile çoğalmasını arttırmak için KS membranların azot veya argon gazı ile işleme sokulur. Gözenek yapısını makro ve mikro gözenekler ile değiştirmek amacıyla ozon veya UV ışını ile farklı polimerler KS filmlere modifiye edilebilir.

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan dialdehit varlığında hazırlanan KS filmler geliştirilmiş mekanik özellikler ve daha iyi şişme davranışı sergiler. Film yapılarına inorganik partiküllerin dahil edilmesi ile sinerjistik etki ve yüksek performanslı iyileşmeyi sağlar (Croisier ve Jerome, 2013, s.786).

2.1.5.6. Hidrojeller

Jeller tipik olarak toplam hacmin %10'undan az olan katı faz ve sıvı fazdan oluşur. Hidrojellerde sıvı faz sudur. Jelin kıvamını katı faz sağlar. Yüksek su içeriği ile dokulara yüksek uyum gösteren hidrojeller, hastaya uygulama sırasında çevresindeki dokuya minimum oranda zarar verir. Mekanik özellikleri yumuşak vücut dokularının özelliklerini taklit eder ve bu durum onarılabilecek doku ile hidrojellerin hem fonksiyonel hem de morfolojik olarak benzer olmasını sağlar (Croisier ve Jerome, 2013, s.783).

Polimerler arasındaki bağlar kullanılarak büyük miktar su emebilen ve üç boyutlu yapıya sahip olan hidrojeller, ilaç küçük molekülleri taşıyabilme özelliklerinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılır. Yardımcı maddeye ihtiyaç duyulmadan jel haline gelebilen KS, biyolojik sıvılar ile de bazı ortak özelliklere sahiptir. Hazırlanan KS hidrojellerin özellikleri molekül ağırlığına, çapraz bağlanma derecesine ve yüklere bağlı olarak değişiklik gösterir (Ali ve Ahmed, 2018, s.277; Shukla vd., 2013, s.53). Ayrıca yüksek oranda film oluşturma yeteneğine sahip olan KS, küçük moleküllü antibiyotikler, nükleik asit ve protein gibi moleküller için taşıyıcı olarak kullanılabilir. Çapraz bağlı KS filmleri, oral, transdermal, bukkal, sublingual ve peridontal gibi çeşitli alanlarda ilaç taşıyıcı sistem olarak araştırılmıştır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda kontrollü ve sürekli salım özelliklerine sahip oldukları görülmüştür (Ali ve Ahmed, 2018, s.276).

2.1.5.6.1. KS hidrojel çeşitleri

Üç ana KS hidrojel tipi mevcuttur. Bunlar KS'nin fiziksel olarak bağlantılı olduğu hidrojeller, metal iyonlarıyla koordine edildiği hidrojeller ve kimyasal olarak çapraz bağa sahip hidrojellerdir.

Fiziksel olarak çapraz bağlanmış hidrojeller

Fiziksel hidrojellerin oluşumu polimer zincirleri arasında meydana gelen geri dönüşümlü etkileşimler sonucu ortaya çıkar. Bu etkileşimler elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler veya hidrojen bağları gibi kovalent olmayan yapıya sahiptir. Meydana gelen bu etkileşimler pH, konsantrasyon, sıcaklık gibi farklı parametrelere bağlı olabilir. Daha

az sayıda etkileşim daha yumuşak bir jel yapısına yol açarken fazla etkileşim ile daha sıkı ve daha sert bir jel elde edilir.

KS katkı maddesine ihtiyaç duymadan tek başına jel oluşturabilir. Bu durum amino gruplarının nötralizasyonu ve bu sebeple KS zincirler arasındaki itmenin ortadan kalkması ile gerçekleşir. Termo-duyarlı KS hidrojeller KS'nin gliserol fosfat disodyum tuzu olarak poliyol tuzları ile karıştırılması ile elde edilebilir. Pozitif yüklü KS, hidrojeller oluşturmak amacıyla fosfatlar, sülfatlar ve sitrat iyonları gibi negatif yüke sahip moleküller ile etkileşim gösterir. Değişken konsantrasyon, anyonik moleküllerin büyüklüğü ve D-glukozamin birimlerine karşılık N-glukozamin birimlerinin sayıları hidrojelin özelliklerini belirler (Croisier ve Jerome, 2013, s.783).

Fiziksel olarak çapraz bağlanmış KS bazlı hidrojeller kovalent olmayan yapıları nedeniyle pH, sıcaklık gibi dış uyaranlara karşı duyarlıdır. Ayrıca fiziksel etkileşimler yenilenebildiğinden geri dönüşümlüdür (Pella vd., 2018, s.234).

Koordinasyon kompleksi ile çapraz bağlanmış KS hidrojeller

Platinum (II), Palladyum (II) ve Molibden (VI) gibi metal iyonları ile KS arasında koordinasyon kovalent bağlar oluşabilir. Ancak bağların oluşumu ile ortaya çıkan hidrojeller biyomedikal kullanım için uygun değildir (Oryan, ve Sahvieh, 2017, s.1005, Croisier ve Jerome, 2013, s.785).

Kimyasal olarak çapraz bağlanmış KS hidrojeller

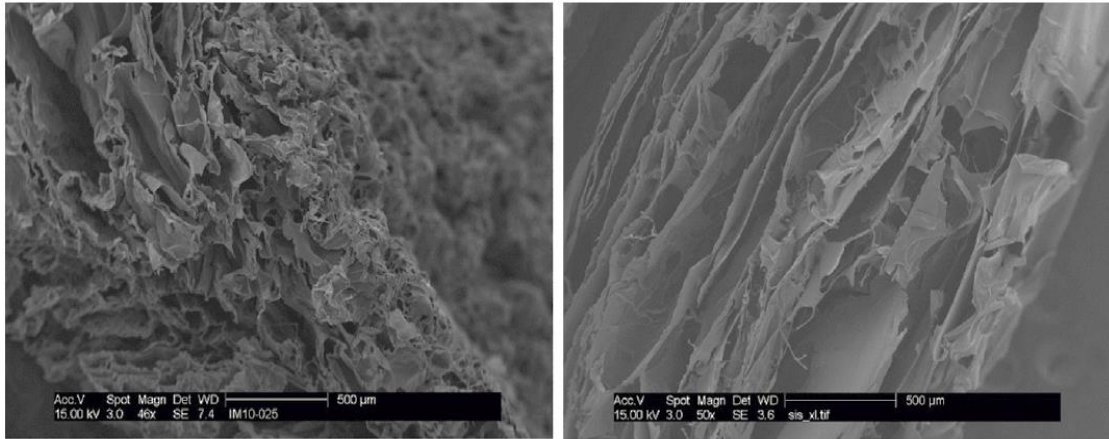
Mekanik olarak dayanıklı ve kararlı hidrojel üretimi için kimyasal çapraz bağlama yöntemleri kullanılır. Ayrıca fiziksel olarak çapraz bağlamanın aksine homojen hidrojellerin üretimi için bu yöntem kullanılır (Pella vd., 2018, s.237).

Genel olarak kullanılan kimyasal çapraz bağlama yöntemleri serbest radikal polimerizasyon, yoğunlaşma reaksiyonları ve ilave reaksiyonları olarak sınıflandırılabilir. Bu yaklaşımı etkileyen faktörler çapraz bağlanma ajanının konsantrasyonu ve çapraz bağlanma zamanıdır. Radikal polimerizasyon için KS polimerize edilebilir gruplara sahip olacak şekilde modifiye edilebilir. Fotopolimerizasyon UV veya görünür ışık ışınması ile foto başlatıcılar tarafından üretilen serbest radikallerle başlatılır, monomerlerin çift bağlarına saldıran radikaller ile polimer bağı üretilir. Bu yöntem doku mühendisliği ve ilaç taşıyıcı sistemlere uygulanır, çünkü fizyolojik koşullar ele alındığında hızlı bir polimerizasyon sağlanır (Pella vd., 2018, s.237).

Kovalent bağı hidrojenlerin üretiminde KS ile glutaraldehit gibi bileşikler arasındaki reaksiyondan faydalanılabilir. Fakat kullanılan bu maddeler toksik kabul edilir ve biyolojik uygulamalar için genipin gibi biyoyumlu ajanlar tercih edilir (Pella vd.,2018, s.237).

2.2. Kitosan Mikrosüngerler

Yara, yanık ile deride oluşan geniş alan yaralanmaları iyileşmeyi geciktirecek ve ciddi sorunlara sebep olabilecek bakteriyel enfeksiyonlara sebep olabilir. Geleneksel yara pansumanı yaranın korunmasını sağlar ancak bakteriyel büyümeyi inhibe edebilecek şekilde enfeksiyonun önlenmesini ve iyileşmeyi desteklemez. Bu yüzden yara iyileşmesine de katkıda bulunacak yeni yara pansumanlarının araştırmaları devam etmektedir (Li vd., 2011, s.4733). Yara pansumanında kullanılacak olan malzeminin ara yüzeyde nemli bir ortam muhafaza etmesi, gaz değişimine izin vermesi, mikroorganizmalar için bariyer olması gerekmektedir. Ayrıca toksik ve alerjik özellikte olmamalıdır. Kitosan mikrosünger (KM) yapıları (Görsel 2.1.) nemli ortam sağlayabilmesi, yüksek şişme kapasitesi ve yara izi oluşturmadan yara iyileşmesine yardımcı olması gibi özellikleri sebebiyle tercih edilen sistemlerdir (Jayakumar, vd., 2011, s.334). Yara pansumanlarında kullanılan KM'ler zamanla tam bozulmaya uğraması sayesinde, ikincil bir işleme gerek kalmadan kas-iskelet yaralanmalarında kullanılabilir (Berretta, Bumgardner ve Jennings, 2017, s.241).



Görsel 2.1. Kitosan mikrosüngerlerin SEM görüntüleri (Berretta, Bumgardner ve Jennings, 2017, s.243)

Doku mühendisliğinde oldukça popüler olarak kullanılan KS; hidrojel, lif, zar, nanokompozit, iskele ve süngerler şeklinde hazırlanır. Bu alanda KS kullanımı kemik, karaciğer, nöral doku, vasküler doku, kırık ve deri gibi çeşitli dokular için bildirilmiştir (Ko, vd., 2010, s.341). KM'ler yara iyileştirme özelliklerinin yanı sıra dolgu maddesi olarak kemik-doku mühendisliğinde de kullanılabilirler. Hazırlanan KS/trikalsiyum fosfat ve KS/kollajen

içeren süngerler kemik rejenerasyonunda iskele olarak kullanılmıştır (Croisier ve Jerome, 2013, s.785).

Farklı aktif bileşenler ile kolayca modifiye edilebilen KS, çeşitli hücre tiplerinin bağlanmasını ve çoğalmasını da destekler (Revi, vd., 2014, s.3273). Farklı polimerlerin KS çözeltisine ilave edilmesi ile fizikokimyasal özellikleri etkili bir şekilde değiştirilebilir. Örneğin KS'nin uygun oranlarda sodyum alijinat ve kollajen ile karıştırılmasıyla, su emme yeteneği, yapışkanlık, gerilme kuvveti ve KM'nin parçalanabilirliğinin arttırıldığı gözlemlenmiştir (Li, vd.,2011, s.4733).

KM'ler antibiyotik, antiinflamatuvar etkin maddeler ve büyüme destekleyici proteinler gibi etkin maddelerle kolaylıkla yüklenebilen, zaman içinde degrade olarak etkin madde salımı gerçekleştiren biyomateryallerdir. Etkin maddelerin bu yapılara kolaylıkla yüklenebilmesi, KS'nin kısmen katyonik yapısına atfedilebilir. Bu polimer ile sulu proteinler, negatif yüke sahip etkin maddeler arasında, şişme ve elektrostatik etkileşimler gerçekleşir. Ayrıca katyonik yapı, süngerlerin hedeflenen dokularda tutulması için kullanılan, mukozal ve diğer yapıdaki dokulara yapışabilen muko-yapışkanlık özelliği sağlar. Farklı materyallerle karıştırma, türevlendirme, çapraz bağlama, tamponlama gibi modifikasyonlar ile süngerlerin degradasyonu, ilaç salım mekanizmaları ve dokuların tepkisi optimize edilebilir. Fonksiyonel moleküllerin kovalent bağlanması ile çoklu rahatsızlıklar tedavi edilebilir. Gözenekli yapı sayesinde artan ilaç yüklemesi ile birkaç gün boyunca inhibitör özellikteki antibiyotiklerin salımını sağlar (Berretta, Bumgardner ve Jennings, 2017, s.241).

2.2.1. KM'lerin üretimi

Gözenekli yapı iskelelerinin gözenek yapılarını kontrol etmek için birçok yama imalat tekniği geliştirilmiştir. Bunlar arasında dondurularak kurutma, pıhtılaşma, gaz oluşturma, elyaf bağlama, elektrospınleme, termal olarak indüklenen faz ayrımı ve hızlı fototipleme bulunur (Ko, vd. 2010, s.341).

KM hazırlamak için en çok kullanılan yöntemlerden biri liyofilizasyondur. Dondurarak kurutma olarak da adlandırılan liyofilizasyon, maddeye verilen zararı azaltmak ve maddelerin yapısal ve kimyasal bütünlüğünü korumak amacıyla, donmuş bir maddeden sıvıyı süblime etme yöntemidir. KM'leri üretiminde kullanılan bu yöntem ile süngerde gözenekler oluşur ve bu sayede katı durumdaki KS'lerden daha büyük bir yüzey alanı elde edilir. Artan yüzey alanı ile taşıyıcı sisteme yüklenebilecek olan etkin madde miktarı arttırılabilir. Ayrıca çözelti

içerisindeki KS konsantrasyonu kontrol edilerek, donma koşulları, farklı gözenek yapıları ve büyüklükleri elde edilebilir (Berretta, Bumgardner ve Jennings, 2017, s.243).

Kontrollü gözenek boyutuna sahip KM üretimi için termal kaynaklı faz ayırımı yöntemi ideal bir yöntemdir. Faz ayırma işlemi, polimer açısından zengin faza sahip olan ve belirli bir sıcaklıkta zayıf faza ayrılma eğiliminde olan, termodinamik açıdan kararlı olmayan homojen polimer çözeltisinde gerçekleşir. Daha sonra dondurularak kurutma işlemi sırasında, polimer açısından zengin olan faz lifli yapıda matris oluştururken, zayıf faz gözeneklere dönüşür. Bu sebeple daha küçük çapa sahip olan süngerler için faz ayırma işlemini modifiye etmek amacıyla uygun çözücü sistemleri geliştirilebilir (Xing, vd., 2018, s.70).

Ko ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada KM'ler şablon olarak buz partiküllerinin kullanıldığı bir yöntemle üretilmiştir. Buz parçalarının üzerine dökülen sulu KS çözeltisi 1 saat oda sıcaklığında tutulduktan sonra -80°C 'de dondurulmuştur. Daha sonra liyofilizasyon ile KM'ler üretilmiştir. Bu yöntemle gözenekli yapıya sahip bir üst yüzey tabakası ve geniş gözenekler arasında dağılım gösteren küçük gözenekli bir yapı oluşmuştur (Ko, vd., 2010, s.344).

2.2.2. KM'lerin karakterizasyonu

2.2.2.1. FT-IR

Xing ve arkadaşları, hazırladıkları KM'lerin fizikokimyasal karakterizasyonunu belirlemek için yaptıkları çalışmada FT-IR kullanmışlardır. Kimyasal bağ karakterizasyonunu belirlemek için FT-IR kullanılmıştır (Xing vd., 2018, s.70).

2.2.2.2. Termogravimetrik analiz

Termogravimetrik analiz (TGA) sıcaklığın belli bir hızda kademeli olarak yükseltildiği ve kontrollü atmosfer altında sıcaklıktaki artış sebebiyle madde tarafından kaybedilen ağırlığın ölçülerek numunelerin termal kararlılığını ölçen bir tekniktir. Matsvaire hazırladığı KM'lerin termal kararlılığını ölçmek için yaptığı çalışmada TGA yöntemini kullanmıştır (Matsvaire, 2017, s.30).

2.2.2.3. Diferansiyel tarama kalorimetresi

Maddelerin termal özellikleri ve sıcaklık değişimi ile meydana gelen değişiklikler diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) ile tespit edilir. Matsvaire yaptığı çalışmada KM'lerin termal özelliklerini aydınlatmak amacıyla DSC yönteminden faydalanmıştır (Matsvaire, 2017,s.30).

2.2.2.4. *Morfoloji*

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) maddelerin yüzey morfolojisinin incelendiği bir yöntemdir. Xie ve arkadaşları çapraz bağlanmış KM'lerin yüzey morfolojisini aydınlatmak amacıyla SEM'i kullanmışlardır (Xie vd., 2018,s.1227).

2.2.2.5. *¹H-NMR (Nükleer manyetik rezonans)*

Hu ve arkadaşları sentezledikleri, hidroksibütil modifiye KM'lerin moleküler yapısını ve süstitüsyon derecelerinin belirlemek için ¹H-NMR analiz yönteminden faydalanmışlardır (Hu vd., 2018,s.155).

2.2.2.6. *X- ışını kırınımı*

Parker ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, KM'lerin kristalliğini değerlendirmek amacıyla X ışını kırınımı (XRD) kullanılmıştır (Parker vd.,2016, s.79).

2.2.2.7. *KM'lerin pH ölçümü*

KM'lerin pH değerinin belirlenmesi için tam olarak tartılmış olan formülasyon sonikasyona tabi tutulur ve daha sonra su (pH 7.0) ile dağıtılmıştır. Elde edilen çözeltiler 15 dakika boyunca 1500 rpm'de santrifüj edilir ve sünger pH'sı belirlenir (Nagarajan vd., 2015, s.21)

Yüzey pH'sının belirlenmesi için oda sıcaklığında 2 saat boyunca 2 ml tükürük sıvısı (pH 6.8) ile temas ettirilen süngerin şişmesi sağlanmıştır. Daha sonra pH ölçümü için pH metrenin elektrodu sünger yüzeyi ile temas ettirilmiş ve 1 dakika boyunca dengelenmesine izin verildikten sonra ölçüm yapılmıştır (Kasseem, El-Meshad ve Fares, 2015, s.539).

2.2.2.8. *Şişme indeksi*

Süngerlerin şişme indeksini belirlemek için yapılan çalışmada, KM'ler ayrı ayrı tartıldıktan sonra (W₁), %2 agar jel plakaları üzerine yerleştirilmiş ve 37±1°C'de inkübe edilmiştir. 2 saat aralıklarla 8 saat boyunca petri kabından çıkarılan süngerler üzerindeki fazla su filtre kağıdıyla temizlenmiş ve yeniden tartılmış (W₂), şişme indeksi hesaplanmıştır (Kasseem, El-Meshad ve Fares, 2015, s.539).

$$\text{Şişme indeksi} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \quad (2.1)$$

2.2.2.9. *Mekanik dayanıklılık*

Sünger örneklerinin mekanik dayanıklılığını test etmek amacıyla yapılan çalışmada, sünger örnekleri paralel diskler halinde dilimlenmiş ve sıkıştırma uygulanarak incelenmiştir. Örnekler orijinal kalınlıklarının %80'ine kadar 1 mm/dk'lık yer değiştirme oranı ile sıkıştırılmıştır. Kesilen tabakaların gözenekliliği ise doymuş hale gelene kadar etanole batırılan süngerlerin, alkole batırılmadan ve batırıldıktan sonra tartılması ile hesaplanmıştır (Hu vd., 2018, s.155).

$$P = \frac{W_2 - W_1}{(\rho V_2 - \rho V_1)} \times 100 \quad (2.2)$$

W_1 = Alkolün içine daldırılmadan önceki ağırlık

W_2 = Alkole daldırıldıktan sonraki ağırlık

V_1 = Daldırma işleminden önce alkol hacmi

V_2 = Daldırma işleminden sonra alkol hacmi

ρ =Normal sıcaklıktaki alkol yoğunluğu

2.2.2.10. *İlaç içeriğinin belirlenmesi*

Kassem ve arkadaşları hazırladıkları KM formülasyonu içerisine yüklemiş oldukları buspiron HCl miktarını belirlemek için, KM'leri oda sıcaklığında 250 ml simüle tükürük sıvısı (pH 6.8) ile ekstre etmiştir. Daha sonra 0.45 µm filtreden süzdükten sonra buspiron HCl konsantrasyonunu 240 nm'de spektrofotometrik olarak belirlemişlerdir (Kassem, El-Meshad ve Fares, 2015, s.539).

2.2.2.11. *In vitro salım*

Nagarajan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada KM'leri pH 7.4 ile dolu olan 250 ml'lik beherlere daldırarak 50 rpm'de 37 ° C'de *in vitro* salımı gerçekleştirmiştir. Örnekler belirlenen zaman aralıklarında toplanarak UV-spektrometrede ölçülmüştür (Nagarajan vd., 2015, s.21).

Başka bir çalışmada buspiron HCl yüklü KM'lerin *in vitro* salımı modifiye edilmiş standart Aparatus 1 kullanılarak yapılmıştır. Süngerin bir tarafı siyanoakrilat yapıştırıcı kullanılarak karıştırma çubuğunun alt ucuna tutturulmuştur. 37 ± 1 ° C'de 250 ml simüle

tükürük sıvısı (pH 6.8) ile doldurulmuş ve 100 rpm'de karıştırılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında alınan örnekler spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Kasseem, El-Meshad ve Fares, 2015, s.540).

2.2.3. KM ile yapılan çalışmalar

Denkbaş ve arkadaşları, yara örtü malzemesi olarak norfloksasin ile kapsüllenmiş KM'ler hazırlamış ve karakterizasyon çalışmalarını yapmışlardır. Bu çalışmada süngerlerin şişme davranışı, norfloksasin yükleme kapasitesi, *in vitro* salım özellikleri ve antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. Çalışmada çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun, norfloksasin/KS oranının, KS molekül ağırlığının etkileri araştırılmıştır. Norfloksasin salımında başlangıçta kontrollü olarak şişirildiği ve uzatılmış periyotlarda difüzyon kontrollü olduğu, antibakteriyel aktivitenin ise serbest bırakma oranıyla doğru orantılı olduğu bulunmuştur (Denkbaş vd, 2004, s.301).

Jayakumar ve arkadaşları, dondurarak kurutma yöntemi ile yara iyileştirici materyal olarak ZnO'in dahil olduğu bir KM hazırlamışlardır. Bu mikrosünger (MS)'in antibakteriyel özellikleri, kan pıhtılaşmasına etkisi, şişme, hücrelere bağlanma ve sitotoksitesisi değerlendirilmiştir. Nanokompozit özellikteki süngerin şişme ve antibakteriyel aktivitesinde artış gözlenmiştir. Ayrıca sitotoksitesite çalışmaları ile insan dermal fibroblast hücrelerine karşı toksik olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar ile nanokompozit süngerin potansiyel yara pansuman malzemesi olabileceği öngörülmüştür (Jayakumar, vd., 2011, s.334)

Parker ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, lokal antibiyotik verme sistemi sağlayan KM'leri geliştirilmiştir. süngerleri modifiye etmek amacıyla PEG kullanılmıştır. Süngerlere uygulanan PEG modifikasyonu ile, mantar enfeksiyonlarında kullanılan amfoterisin B'nin lokal olarak uygulanması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda PEG ile modifiye süngerlerin, yapısında modifikasyon bulunmayan süngerelere göre, dikkat çekici amfoterisin B yüklemesi yapılabildiği, süngerlerin *in vitro* salım sağlayan biyoyumlu ve biyobozunabilir süngerler olduğu görülmüştür (Parker vd., 2016, s.86).

Griffon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kırık onarımı için poliglolik asit (PGA) ile modifiye KM'ler üretilmiştir. Bu çalışma için KS kırıkdağın ekstraselüler yapısında bulunan glikozaminoglikanlar ile yapısal bir benzerliğe sahip olması sebebiyle tercih edilmiştir. Çalışma sonucunda KM'lerin gözenek büyüklüğünün artırılması ile daha fazla kondrosit içeren yapıların üretimi gerçekleşmiştir. Yalnız KS varlığında *in vitro* kırık onarımı mümkün olsa da PGA modifiye süngerler aracılığıyla üretilen yapıların bileşimi doğal kırıkdağ yapısına daha

yakındır. Ancak *in vivo* implantasyondan sonra biyolojik etkilerin değerlendirilmesi için çalışmalar gerekmektedir (Griffon vd., 2006, s.320).

KS parçalanma ürünü olan N-asetilglukozamin ile yara iyileştirici ve kemik oluşumunu uyarıcı bir etkinlik gösterebilir. Bu etkinliklerine ek olarak KS farklı biyoaktif maddelerin salınımını da düzenleyebilir. Park ve arkadaşları KS'nin trombosit kaynaklı büyüme faktörünün salınımını düzenleyebilmesi sayesinde kemik oluşumu indükleyen KM'ler geliştirmiştir. Çalışmada büyüme faktörünün *in vivo* koşullarda hızla elimine edilmesi ve uygulama sırasında terapötik konsantrasyonun sürdürülememesi sebebiyle KM'lerden kontrollü olarak salınan bir formülasyon geliştirilmiştir. Çalışma sonucunda KM'ler yeterli hücre adaptasyonu ve kemik hücrelerinde yüksek oranda iyileşme göstermiştir (Park vd., 2000, s.158).

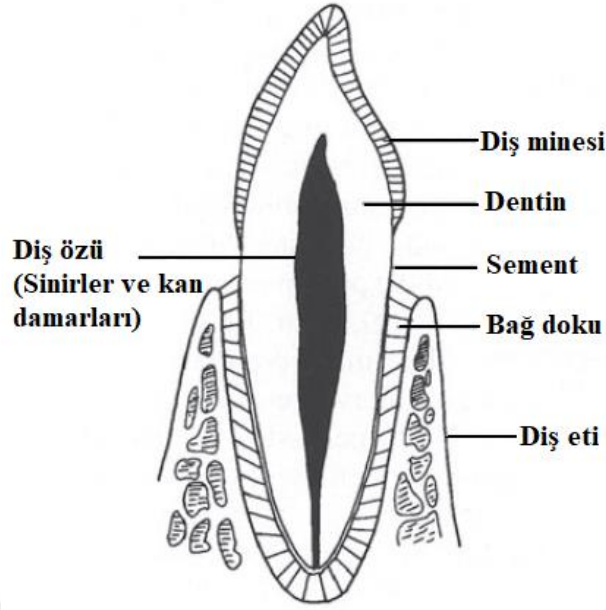
Hnátová ve arkadaşları KS ve β -siklodekstrin karışımı ile KM'ler hazırlamıştır. Çalışmada kimyasal modifikasyonlardan uzak durularak doğal maddelerle çalışmak hedeflendi. Hazırlanan KM'ler etkin maddenin sürekli salım gösterdiği topikal preparatlar olarak tasarlandı. KS çözeltisine çapra bağlayıcı madde olarak eklenen β -siklodekstrin ile oluşan KM matrisi etkin maddenin sürekli salımını sağladı (Hnátová vd., 2016, s.1266)

Yapılan başka bir çalışmada doku mühendisliğinde kullanılmak amacıyla KS film ve süngerden oluşan iki tabakalı formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan KM'lerin gözenek büyüklüklerinin uygun boyutta olması amacıyla sodyum klorür, glikoz ve sükröz gibi porojen maddeler kullanılmıştır. Filmler döküm, KM'ler liyofilizasyon yöntemi ile üretilmiştir. Oluşan iki farklı yapı birkaç kez seyreltik sodyum hidroksit ve su ile yıkanmıştır. Elde edilen ıslak malzemeler tekrar dondurulmuş ve iki tabakalı yapıyı oluşturmak için tekrar liyofilize edilmiştir. Formülasyon hazırlandıktan sonra neofetal dermal fibroblastlar sünger tabakaları içine ekilmiştir. 4 haftalık hücre kültürü sonucunda hücrelerin büyüdüğü ve çoğaldığı gözlenmiştir. *In vitro* çalışmalar sonucu cilt dokusu mühendisliğinde iskele olarak kullanılan KS materyallerinin bazı kolajen materyallere alternatif olduğu sonucuna varılmıştır (Ma vd., 2001, s.335).

2.3. Ağız ve Diş Yapısı

2.3.1. Dişin genel yapısı

Diş genel olarak diş minesi, dentin, diş eti (gingiva), diş özü ve sement (cementum) bölümlerinden meydana gelir (Şekil 2.3.) (Türp ve Alt, 1998, s.73).



Şekil 2.3. Dişin yapısı (Türp ve Alt, 1998, s.73).

Diş minesi, dişin ağız ortamıyla temasta olduğu dış kısımdır ve diş etinin altındaki bölümlerde bulunmaz. Dişi fiziksel, kimyasal ve mikrobik saldırılardan korur. Diş minesinin sertliğini iyon değiştirme özelliğine sahip olan hidroksiapatit sağlar (Tırnaksız, F.,2004, s.197). Ağırlıkça %95 inorganik maddeler, %1 organik maddeler ve %4 sudan oluşmaktadır (Türp ve Alt, 1998, s.73).

Dentin diş minesinin altında bulunan, içerdiği maddelere bakıldığında diş minesi ile benzerlik gösteren ve diş yapısında gözeneklilik veren tüpçüklerden oluşan bir tabakadır. Diş minesine benzerlik gösteriyor olmasına rağmen daha yumuşak yapıdadır, asit ve aşınmaya karşı daha dayanıksızdır (Tırnaksız, F.,2004, s.197). Kimyasal olarak ağırlıkça %70 inorganik (hidroksiapatit kristalleri şeklinde kalsiyum ve fosfat), %20 organik (kolajen) ve %10 sudan meydana gelir (Türp ve Alt, 1998, s.73).

Diş özü, kan damarlarının ve sinir hücrelerinin bulunduğu bölgedir. Bu bölgede herhangi bir uyarı diş ağrısına sebep olur. Diş kökü, dişin oluşturduğu kemiğe bir zarla bağlı olan ve sement adı verilen bir tabaka ile kaplı durumdadır (Tırnaksız, F.,2004, s.197). Diş özü etrafındaki periodontoblastik boşluk dentin sıvısı adı verilen bir sıvı ile doludur (Türp ve Alt, 1998, s.73). Diş eti, dişin diş minesi bulunmayan kısmını korumakla görevli olan tabakadır (Tırnaksız, F.,2004, s.197).

Periodontium tabakası, dişi çenede bulunan diş boşluğunda tutan ve destekleyen yapıdır. Anatomik ve fonksiyonel olarak periodontiyum tabakasına ait olan kök sement, kök dentini

ince bir tabaka halinde çevreler. Yaklaşık olarak ağırlığının %61'i inorganik maddelerden, %27'si organik maddelerden ve %12'si sudan oluşur (Türp ve Alt, 1998, s.73).

2.3.2. Ağız mikroflorası

Ağız boşluğu, yumuşak ve katı yüzeyleri birlikte bulundurması, yüzeyleri yıkayan tükürük ve diş eti sıvısının varlığı ve dış ortama açık olması nedeniyle ekolojik olarak farklı mikroçevre ve dolayısıyla farklı mikrofloralar içerir. Ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmaların yerleşmesini ve üremesini sıcaklık, pH gibi fizikokimyasal faktörler, ağız bakımı, genetik durum gibi konak faktörleri ve bakteriyel faktörler etkiler. Mikrofloranın dengesini, kolonizasyon direnci sağlar. Dengenin bozulması sonucu ağız ve diş rahatsızlıkları meydana gelir (Altan, 2010, s.12).

Doğumdan itibaren steril olarak kabul edilen oral florada Stafilokok, Streptokok, Koliform grubu bakteri ve Gram pozitif bakteriler bulunabilir. Ağızda bulunan mikroorganizmaların çoğu patojen olabilir ve diş çürüğü diş eti iltihabı gibi enfeksiyonlar normal flora bakterileri ile oluşan enfeksiyonlardır. Ağız boşluğunda mikrofloranın erişebileceği üst sınır tükürük, ağız hareketleri vb. ile sınırlanır. Tükürüğün yıkayıcı etkisi ve çiğneme, dil ve dudak hareketleri gibi hareketler mikroorganizmaların diş yüzeyinden uzaklaşmasını sağlar. Diş plağı mikroflorasında mikroorganizmalar, tükürük glikoproteinleri, hücre dışı mikrop ürünleri, dökülmüş epitelyum hücreleri, lökositler ve eritrositler bulunur (Altan, 2010, s.13).

2.3.3. Diş çekimi

Kök oluşumu tamamlanmış olmasına rağmen diş dizisinde yerini alamamış ve kemik ve yumuşak doku içerisinde kısmen ya da bütünüyle kalmış olan dişleri gömülü diş olarak tanımlanmaktadır. Periodontal problemlere, kist ve tümörlere, ortodontik problemlere ve çene ile yüz bölgesinde sebebi bilinmeyen ağrılara sebep olabilir. Bu semptomların ve patolojik durumların önlenmesi için yirmi yaş dişleri profilaktik olarak çekilmektedir (Ciğerim, 2015, s.1).

Yirmi yaş dişi çekimi genellikle lokal anestezi altında gerçekleştirilir. Post-operatif olarak sıklıkla ağrı, ödem ve trismus görülür (Ciğerim, 2015, s.1, Özkan, 2008, s.4). Görülen bu belirtiler vücudun savunma mekanizması olan enflamasyon sebebiyle gerçekleşmektedir. Cerrahi girişimlerden sonra bu enflamasyon üç fazda meydana gelmektedir. İlk olarak histamin ve serotonin serbestleşir ve serbest duyu sinir uçlarında direkt olarak ödem oluşmasında etkili

olurlar. Birinci fazdan 30-60 dakika sonra meydana gelen ikinci fazda bradikinin, hiperaljezi ve artan damar geçirgenliğine sebep olur. Son fazda ise prostoglandin etkilidir ve ağrı ile enflamasyonun uzayan süreci tamam prostoglandin ile bağlantılıdır (Özkan, 2008, s.5).

2.3.3.1. Ağrı

Ağrı, Uluslararası Ağrı Teşkilatı tarafından, vücudun herhangi bir yerinden kaynaklanan olası bir doku hasarı ile birlikte seyreden, insanın geçmişteki tüm deneyimlerini kapsayan, hoş olmayan, endişe verici ve duyusal bir algı olarak tanımlanır. Ağrı rahatsız edici bir uyarıcı olarak doku hasarının yaklaşması veya ortaya çıkması ile başlar (Ciğerim, 2015, s.5).

Ağrının tedavisinde öncelikle göz önünde bulundurulması gereken nokta ağrının türüdür. Nöropatik ağrı merkezi ya da periferik sinir sistemi lezyonları sonucu meydana gelirken enflamatuar ağrı akut veya kronik enflamasyonlara bağlıdır. Nöropatik ağrı, nörotransmitler ve glutamat, aspartat ve P maddesi gibi peptidlerin salınımı ile ortaya çıkarken, enflamatuar ağrı eikonosidler gibi çözünür aracı maddelerin salınımı ile meydana gelir (Ciğerim, 2015, s.5).

Gömülü yirmi yaş dişlerinin çekiminden sonra oluşan ağrı, normal olarak kabul edilir. Lokal aneztezinin kaybolmaya başlaması ile ortaya çıkar ve çekimden sonraki ilk 12 saatte maksimum düzeye ulaşır (Ciğerim, 2015, s.6).

2.3.3.2. Enflamasyon

Gömülü yirmi yaş dişinin çekiminden sonra vazodilatasyon ve artmış vasküler permabilite meydana gelir ve hücreler arasında kan elemanları birikir. Çevre dokulara fazla miktarda sıvı ve protein geçişi ile birlikte ödem meydana gelir. Çevre dokulara gerçekleşen plazma çıkışı bradikinin gibi enflamatuar mediatörlerin sürekli serbestleşmesi ile oluşur. Prostoglandinler bradikinin etkisini arttırırken, bradikinin varlığı da prostoglandin sentezini uyarır. Bu durum enflamasyonun klinik belirtisinin uzamasına sebep olur (Özkan, 2008, s.14).

Alt çenedeki gömülü yirmi yaş dişinin cerrahisinden sonra bölgede meydana gelen ödem trismusun sebepleri olabilir ve bu durumun bir veya birkaç gün içinde geçmesi öngörülür (Ciğerim, 2015, s.3).

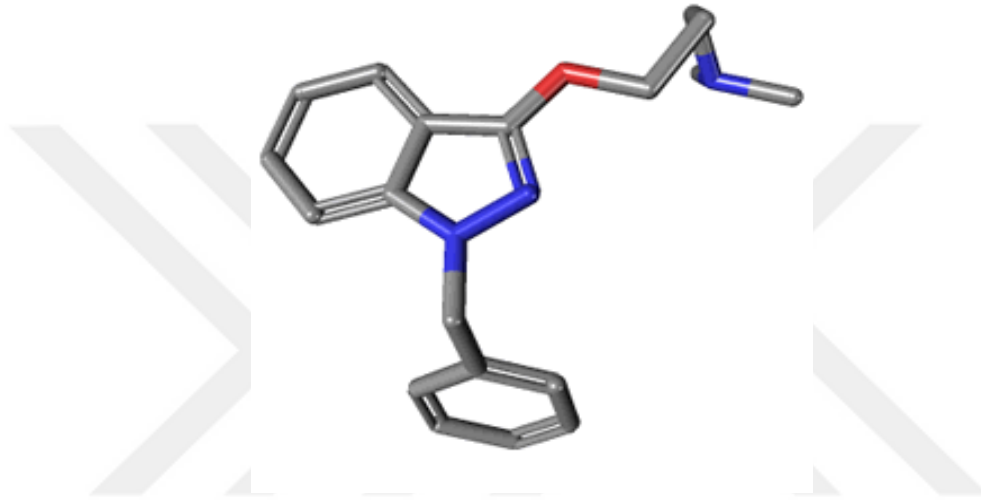
2.4. Benzidamin HCl

BNZ ilk defa 1960'ların Angelini araştırma laboratuvarlarında sentezlenen lokal anestezi ve analjezik etki gösteren bir etkin maddedir (Settimi vd., 2012, s.1). Ağız boşluğu,

yumuşak dokular ve cildin enflamatuvar koşullarının hafifletilmesi amacıyla kullanılır. BNZ anestezik, antienflamatuvar, antipiretik ve antimikrobiyal özelliklere sahiptir. Ayrıca yapılan çalışmalar anti-TNF etkisi sebebiyle mukozal ülserasyon tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir (Karavana vd., 2011, s.973).

2.4.1. Fizikokimyasal özellikleri

BNZ 3-(1-benzilindazol-3-iloksi) propil dimetil amin hidroklorür olarak isimlendirilen bir amin bileşiğidir (Şekil 2.4.) (Bassuoni vd., 2017, s.66, Çolak 2016, s.204).



Şekil 2.4. Benzidamin HCl'nin 3D moleküler yapısı (<http-1>)

Suda çok çözünür, etanolde (%95) ve kloroformda serbestçe çözünür ve pratik olarak eterde çözünmeyen beyaz kristal toz özelliktedir (Bassuoni vd., 2017, s.66, Çolak 2016, s.204). Erime sıcaklığı 160°C'dir (Çolak 2016, s.204).

Çizelge 2.2. Benzidamin HCl'e ait bazı bilgiler

IUPAC ismi	1-Benzil-3-(3-(dimetillamino)propksiy)-1H-indazol hidroklorür
Molekül formülü	
Kimyasal isimleri	<ul style="list-style-type: none">• Benzidamin hidroklorür• 132-69-4• 3-(1-benzilindazol-3-il)oksi-N,N-dimethylpropan-1-amin hidroklorür
Molekül ağırlığı	345,871 g.mol ⁻¹

Kaynak: <http-2>

2.4.2. Farmakolojik özellikleri

BNZ yapısındaki -NH₂ fonksiyonel grupları sebebiyle bazik yapıda olmasından dolayı aynı grupta bulunduğu NSAİİ ajanlardan farklıdır. Bu gruba dahil olmasına rağmen tamamen farklı bir kimyasal yapıya, farmakolojik profile ve farmakokinetik özelliklere sahiptir. Cerrahi, travma gibi sebeplerle meydana gelen yumuşak doku zedelenmesi sonucunda ortaya çıkan akut enflamasyonun mekanizmalarını etkileyerek antienflamatuar, antiödemöz ve analjezik etki gösterir. Enflamasyona bağlı olmayan ağrılarda etki göstermez (Ciğerim,2015,s.36).

Antienflamatuar ve analjezik özellikler ve olası yan etkileri ile kontrendikasyonları aynı terapötik sınıfa ait olan ilaçlar ile benzerlik gösterir. BNZ enfekte dokularda birikerek enfeksiyon sırasında oluşan maddelerin zararlı etkilerine karşı dirençli hale gelmiş olan damarları stabilize eder. Membran stabilize edici özelliği ile beyaz kan hücrelerinin enflamatuar süreci teşvik etmesine sebep olacak olan enzimlerin salımını engeller, trombosit ve kırmızı kan hücrelerinde topaklanma önleyici etki gösterir. Ayrıca BNZ çizgili kas hücreleri ve düz kas hücrelerinde antispazmodik etki ile ağrı kesici özellik gösterir (Carlucci, Luliani ve Federico, 2010, s.854).

2.4.3. Farmakokinetik

BNZ gargara olarak kullanılacağında önerilen doz su içinde bulunan HCl tuzunun 4 mmol/l solüsyonunun 15 ml'sidir. Ağız çalkalamak için kullanılması ve tükürük sıvısı ile seyreltilmesi sebebiyle yüksek olan bu konsantrasyon uzun süre etki göstermez. Ticari olarak yaygın olarak kullanılan gargara 4,5-5 pH aralığına sahiptir fakat ağızda tamponlanmadığından tükürük aracılığıyla hızlı bir şekilde pH 7'ye yükselir. Kısa süreli bukkal uygulama ile doku içine emilim oldukça sınırlıdır. Bukkal uygulama ile pik plazma konsantrasyonuna (0,5 mmol/l) 3 saat sonunda ulaşılır belirlenmiştir (Quane, Graham ve Ziegler, 1998, s.96).

BNZ oral yolla alındığında gastrointestinal kanaldan yaklaşık %87 oranında absorbe olur. Alındıktan 1 saat sonra etkin plazma konsantrasyonuna ulaşır ve etkisi 4-6 saat arasında devam eder. Plazma pik konsantrasyonuna hızlı bir şekilde ulaşır (100 mg dozda 0.8 µg.ml⁻¹) (Karavana, 2007, s.5)

BNZ gastrointestinal sistemde tamamen ve hızlı bir şekilde emilim gösterir. Protein bağlama kapasitesi %20'den azdır ve bu durum biyoyararlanımını artırır. Proteinlere az bağlanması ve iyonize olmayan formdaki yüksek lipit çözünürlüğü sebebi ile dokulara serbest bir şekilde diffüze olur. Dağılımı ise dokulara az alınmasına rağmen lipitte çözünen ilaçların

birçoğu ile benzerlik gösterir (Quane, Graham ve Ziegler, 1998, s.96). Eliminasyon yarı ömrü 13 saattir. Vücutta oksidasyon, konjugasyon ve dealkilasyon aracılığıyla öncelikle karaciğerde olmak üzere metabolize olur. Metabolitleri inaktif özelliktedir ve böbreklerden itrah edilir. Sistemik absorpsiyondan 24 saat sonra, dozun %50'si metabolitler ve değişmemiş ilaç olarak idrarda bulunur. Üriner atılım dozun uygulanmasından yaklaşık 3-4 gün sonra tamamlanır (Karavana, 2007, s.6).

Topikal uygulama ile oral yoldan verilen daha düşük dozun dokularda aynı konsantrasyonu sağlaması sebebiyle BNZ lokal enfeksiyonlarda topikal olarak daha etkilidir ve bu kullanım ile sistemik ve toksik etki ihtimali en aza indirgenir (Quane, Graham ve Ziegler, 1998, s.96).

2.4.4. Etki mekanizması

BNZ gargara olarak kullanıldığı konsantrasyonlarda non-spesifik antibakteriyel özellik göstermektedir. 3 mmol/l konsantrasyonda kullanıldığında geniş spektrumlu antibiyotiklere direnç gösteren suşlara karşı antibakteriyel aktivite gösterir. Özellikle tetrasiklinlerin kombinasyonları olmak üzere bazı antibiyotikler ile sinerjistik etki gösterir (Canpolat, 2006, s.19).

Kan damarlarında histaminin oluşturduğu vazodilatasyon ve artmış olan vasküler geçirgenlik BNZ tarafından inhibe edilir. Ayrıca enflamasyon sırasında oluşan damar değişikliklerini azaltarak antienflamatuar etkiye sebep olur (Canpolat, 2006, s.19). Prostaglandin sentezi üzerindeki inhibitör etkisi düşüktür. Hücre membranlarını stabilize ederek araziidonik aside dönüşebilme özelliği olan membran fosfolipitlerinin salınımını inhibe eder (Karavana, 2007, s.4). Ayrıca gastroprotektif prostaglandin sentezini inhibe ederek gastrointestinal toksisite oluşturan aspirin gibi NSAİİ'lerin aksine BNZ bazı şartlar altında prostaglandin sentezini artırır. Etkili bir prostaglandin sentezi olmaması sayesinde gastrointestinal toksisite göstermez. Lipooksijenaz yolunu inhibe ederek antienflamatuar etki de gösterir (Karavana, 2007, s.4; Canpolat, 2006, s.19).

Hücrelerde iki önemli fagosit cevabı olan degranülasyon sonucu litik enzim salımı ve respiratuar patlama sonucu enflamasyon gerçekleşir. BNZ bu iki cevabı inhibe ederek antienflamatuar etki gösterir. Granül ve litik enzim salınımının inhibisyonu, membran stabilize edici aktivite ile açıklanabilir. Ayrıca BNZ insan monositlerini uyarak TNF- α sentezini inhibe eder (Canpolat, 2006, s.19).

2.4.5. Endikasyonlar ve yan etkileri

BNZ'nin kapsül, gargara, krem, aerosol ve vajinal duş preparatları mevcuttur (Acar vd., 2014, s.1). Sistemik kullanım amacıyla tablet olarak kullanılmasına rağmen, yaygın olarak ağız ve boğaz enflamasyonlarında %0,15 konsantrasyonda gargara ve ağız spreyi olarak kullanılır. Ayrıca bazı ülkelerde cilt enflamasyonunu tedavi etmek için jel preparatları da kullanılır (Karavana vd., 2011, s.973).

BNZ sprey ve gargara olarak larenjit, tonsillit, faranjit ve bu enflamasyonlarla ilişkisi ağrının tedavisinde kullanılır. Ayrıca gingivitis, aft gibi ağız ve diş eti hastalıklarında, diş çekimleri ve dental cerrahi sonrasında lokal anestezi ve ağrı kesici olarak kullanılabilir. Post-operatif enflamasyon komplikasyonlarının tedavisinde ve önlenmesinde, travma sonrası oluşan ağrı ve ödem tedavisinde de tercih edilebilir. Bacak venlerini etkileyen flebit, periflebit gibi vasküler bozuklukların tedavisinde kullanılır. Enflamasyonun meydana geldiği servisit, vulvo-vajinit, prostatit, sistit, üretrit gibi ürogenital hastalıkların tedavisinde de yardımcı olarak kullanılabilir (Canpolat, 2006, s.19).

BNZ preparatları konsantre veya kullanıma hazır çözeltiler ve suda eritilecek toz halinde satılmaktadır. Topikal kullanım için hazırlanmış olan preparatlar nadiren görülen yan etkileri ile birlikte genellikle iyi tolere edilir, deri ve mukozadan emilimi ise düşüktür (Settimi vd., 2012, s.1). BNZ kullanımında ürtiker, eritemi döküntü, ışığa karşı duyarlılık, bronkospazm ve böbreklerde fonksiyon bozukluğu gibi yan etkiler görülebilir. Oral kullanımda günlük maksimum dozu 200 mg.gün⁻¹'dir. Halüsinasyon, merkezi sinir sisteminin uyarılması, hiperaktivite, paranoya, ağız kuruluğu ve kasılmalar gibi yan etkiler günlük oral kullanımın 500-3000 mg'a çıktığı durumlarda gözlenebilir (Acar vd., 2014, s.1).

2.4.6. Kullanım dozu

Oral olarak alınan BNZ bir defalık dozu 0.7-1 mg.kg⁻¹'dir. Günde 3 defa 1 draje tok karnına alınabilir. Bir defalık doz 2 drajedir ve günlük toplam alınabilecek en yüksek doz 4 drajedir (Cığırım, 2015, s.37).

2.4.7. BNZ ile yapılan örnek çalışmalar

Karavana ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ağız içinde yer alan mukozal ülserlerin klinik ve histolojik tedavisinde kullanılmak üzere BNZ içeren mukoyapışkan bir jel formülasyonu geliştirilmiştir. Farklı oranlarda hidroksipropilmetil selüloz (HPMC) içeren formülasyonlardan yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda yüksek oranda

mukoyapışma özelliği gösteren ve 24 saat boyunca etkin maddenin *in vitro* salınımını gerçekleştiren formülasyon seçilmiştir. Tavşan dişeti mukozası üzerinde üretilen yaralar sonucu meydana gelen ülseratif alanların iyileşme süreci incelenmiştir. Çalışma sonucunda BNZ içeren jel formülasyonun uygulanması ile ülser boyutunda hızlı bir iyileşme görülmüştür. İnsan oral dokularında iyileşme sürecini etkileyebilecek farklı faktörler bulunmasına rağmen BNZ içeren jel formülasyonların topikal tedavi için uygun adaylar olabileceği öngörülmüştür (Karavana vd., 2011, s.978).

Yapılan başka bir çalışmada BNZ içeren, hidroksietil selüloz ve sodyum karboksimetil selüloz ile mukoyapışkan formülasyonlar geliştirilmiştir. Çalışmada terapötik özellikleri sayesinde ilaç taşıyıcı sistemler olarak çok yaygın olarak kullanılan emülsiyonlar ve emülsiyonların kararlılığının ve verimliliğinin artırılması için emülsiyon su olan dış fazının başka bir sulu faz ile değiştirilmesi ile ortaya çıkan emulgeller kullanılmıştır. Tüm formülasyonlar reolojik özellikler, salım ve mukoyapışma kuvveti açısından karakterize edilmiştir ve piyasada bulunan bir vajinal krem ile karşılaştırılmıştır. Farklı formülasyonlar arasında vajinal olarak yüksek tolere edilebilirliğe sahip ve hasta uyuncunu iyileştirebilecek olan ve aynı zamanda formülasyonlar arasında en iyi *in vitro* ve *ex vivo* performansı gösteren, setostearil alkolün sodyum karboksimetil selüloz ile değiştirildiği emulgel optimum formülasyon seçilmiştir. Ayrıca piyasa preparatı ile karşılaştırıldığında daha yüksek vajinal mukoyapışma gösteren ve daha uzun ilaç kalma süresi gösteren formülasyon ile BNZ etkinliği artırılabilir olduğu görülmüştür (Perioli vd., 2009,s.778).

Özkan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada günde bir kez alınacak tabletler şeklinde BNZ sürekli salım yapan formülasyonlar geliştirilmiştir. HPMC, KS ve bunların farklı oranlardaki kombinasyonları ve farklı üretim teknikleri (ıslak granülasyon, doğrudan sıkıştırma) ile formülasyonlar üretilmiştir. Direkt basım ve ıslak granülasyon yöntemi ile hazırlanan BNZ yüklü hidrofilik matris tabletlerin salım davranışlarının çözünme ortamı, polimer oranları ve pH'dan etkilendiği görülmüştür. Salım kinetiği ve daha iyi hedefleme sağlamasından dolayı %12,5 HPMC ve %12,5 KS içeren formülasyon optimum formülasyon seçilmiştir. Oral olarak verilen BNZ'nin kontrollü salımı ile gelecekte farklı enflamasyon tiplerinin tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Kose-Özkan vd., 2010, s.689).

2.4.8. Piyasa preparatları

BNZ piyasada oral sprey, jel ve gargara preparatı olarak bulunmaktadır. Piyasada bulunan ticari preparatlar Çizelge 2.3.'te sunulmuştur.

Çizelge 2.3. Benzidamin HCl içeren ticari preparatlar (RxMediaPharma® 2019)

Preparat İsmi ve Farmasötik Şekil	Firma	Jenerik/Orijinal
ANDOREX® Gargara	PHARMACTIVE	Jenerik
ANDOREX® Sprey	PHARMACTIVE	Jenerik
BENYZDEX® Gargara	BERKO	Jenerik
BENZYDEX® Oral Sprey	BERKO	Jenerik
CLIORO® Gargara	HELBA	Jenerik
CLIORO® Oral Sprey	HELBA	Jenerik
FARDOBEN® Gargara	DEVA	Jenerik
FARDOBEN® Oral Sprey	DEVA	Jenerik
FARHEX® Gargara	ANGELINI	Jenerik
FARHEX® Sprey	ANGELINI	Jenerik
GERAKS® Gargara	İSTANBUL İLAÇ	Jenerik
GERAKS® Oral Sprey	İSTANBUL İLAÇ	Jenerik
GERAL® Gargara	BİOFARMA	Jenerik
GERAL® Oral Sprey	BİOFARMA	Jenerik
HEKSOBEN® Gargara	ORO İLAÇLARI	Jenerik
HEKSOBEN® Oral Sprey	ORO İLAÇLARI	Jenerik
HEXADAMIN® Gargara	EMKAR	Jenerik
HEXINAT® Gargara	KARFARMA	Jenerik
HEXINAT® Oral Sprey	KARFARMA	Jenerik
KLODAMIN® Gargara	ADEKA	Jenerik
KLODAMIN® Oral Sprey	ADEKA	Jenerik
KLOREMIN® Gargara	LİVA İLAÇ	Jenerik
KLOREMIN® oral sprej	LİVA İLAÇ	Jenerik
KLOROBEN FORT® Gargara	DROGSAN	Jenerik
KLOROBEN FORT® Oral Sprey	DROGSAN	Jenerik
KLOROBEN® Gargara	DROGSAN	Jenerik
KLOROBEN® Oral Sprey	DROGSAN	Jenerik
OROHEKS PLUS® Gargara	TRIPHARMA	Jenerik
OROHEKS PLUS® Oral Sprey	TRIPHARMA	Jenerik
PERİMEX PLUS® Gargara	KENTFARMA	Jenerik
PERİMEX PLUS® Oral Sprey	KENTFARMA	Jenerik
STREPSRAY PLUS® Oral Sprey	RECKITT BENCKİSER	Jenerik
TANFLEX® Gargara	ABDİ İBRAHİM	Jenerik
TANFLEX® Oral Sprey	ABDİ İBRAHİM	Jenerik
TANTUM® Draje	ANGELINI İLAÇ	Orijinal
TANTUM® Jel	ANGELINI İLAÇ	Orijinal

Çizelge 2.3. Benzidamin HCl içeren ticari preparatlar (RxMediaPharma® 2019) (Devamı)

TANTUM VERDE® Gargara	ANGELINI İLAÇ	Orijinal
TANTUM VERDE® Spray	ANGELINI İLAÇ	Orijinal



3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

<u>Madde adı</u>	<u>Firma adı</u>
Agar-agar	Merck/Almanya
Amonyum hidroksit	Sigma-Aldrich/Almanya
Asetik asit	Sigma-Aldrich/Almanya
Asetonitril	Sigma-Aldrich/Almanya
Benzidamin HCl	Berko İlaç
Düşük molekül ağırlıklı kitosan	Sigma-Aldrich/Almanya
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi tablet	Sigma/Almanya
Fosforik asit	Merck/Almanya
Glutaraldehit	Sigma-Aldrich/Almanya
Orta molekül ağırlıklı kitosan	Sigma-Aldrich/Almanya
PEG 6000	Merck/Almanya
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	Sigma-Aldrich/Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich/Almanya
Tripolifosfat	Sigma-Aldrich/Almanya
Trietilamin	Sigma-Aldrich/Almanya
Yüksek molekül ağırlıklı kitosan	Sigma-Aldrich/Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz adı</u>	<u>Firma adı</u>
Derin dondurucu	Liebher Medline, LGEX 3410, Almanya
Differansiyel taramalı kalorimetri	Shimadzu DSC-60, Japonya
Dissolüsyon cihazı	PharmaTest PTWS 820D, Almanya
Distile su cihazı	MilliQ Milipore, Fransa
Hassas terazi	Mettler AM 100, Amerika
İnfrared spektrofotometresi	Shimadzu IR-Prestige-21-Japonya
Kararlılık kabini	Meter D96R, Türkiye
Liyofilizatör	Scanvac CoolsafePro Labogene, Danimarka
Manyetik karıştırıcı	Jeoitech MS-53M, Güney Kore
Mikropipet seti	Eppendorf, Almanya

pH metre	WTW Profi Lab. pH 597, Almanya
Santrifüj	Nüve NF400, Türkiye/Eppendorf 5810, Almanya
Su banyosu	GFL, Tissue float bath 1052, Almanya
Vorteks karıştırıcı	Jeiotech VM96B, Kore
X-ışını kırınım cihazı	XRD-Rikagu Rint 2000, Japonya
YBSK kolonu	Supelco 50254-U 250x4.6 mm
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Schimadzu 20-A, Japonya



4. YÖNTEMLER

4.1. Benzidamin HCl ve Yardımcı Maddeler ile Yapılan Çalışmalar

BNZ'nin, formülasyonda kullanılan kitosan ve PEG 6000'in saflığını ve kalitesini belirlemek amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

4.1.1. Termal analiz

Maddelerin termal analizi DSC (Schimadzu DSC-60, Japonya) cihazı ile basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabı, 50 ml.dk⁻¹ azot gazı akış hızı ve 30-300°C aralığında, 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artışı kullanılarak alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

4.1.2. X-ışını kırınımı

Maddelerin XRD analizinde 5-40° aralığında, 40 kV voltaj, 15 mA akım şiddeti, 2θ açısı ve 2°dk⁻¹ ilerleme hızında, Rikagu jeneratör kullanılmıştır.

4.1.3. FT-IR

Maddelerin IR analizi FT-IR (Schimadzu IR Prestige, Japonya) cihazı kullanılarak, 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

4.1.4. Parçacık şekli ve yüzey özellik

Maddelerin parçacık şekli ve yüzey özelliği karbon bandı üzerine yayılarak SEM (Zeiss Ultra Plus Fesem, Almanya) cihazı ile belirlenmiştir.

4.2. Benzidamin HCl Miktar Tayini İçin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

In vitro çalışmalarda BNZ'nin miktar tayini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz çalışmalarında kullanılan YBSK'nın çalışma koşulları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları

Cihaz	Shimadzu-20 A
Kolon	Supelco 50254-U 250x4,6 mm
Fırın Sıcaklığı	40°C
Mobil Faz	Sodyum Dihidrojen Fosfat Dihidrat Tampon Çözeltisi pH 3.0 / Asetonitril (70/30; h/h)
Dedektör	Floresan Dedektör
Çalışılan Dalga Boyu	212 nm
Akış Hızı	1,5 ml.dk ⁻¹
İnjesiyon Hacmi	20µl

4.2.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışması

Analitik yöntem validasyonunun amacı, kullanılan yöntemin çalışmanın amacına uygun olduğunu kanıtlamaktır. Kullanılan yöntemin doğruluk ve güvenilirlik parametreleri verilerle kanıtlanarak gösterilmektedir. Miktar tayini validasyonunda doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik parametreleri esas alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada Uluslararası Harmonizasyon Kongresi'nin 'Analitik İşlem Validasyon Yöntemi' kullanılmıştır (ICH, 2005, s.1-13).

4.2.1.1. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusalılığı, numunedeki analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olan test sonuçları elde etme yeteneğidir. Analizi yapılan maddenin farklı konsantrasyonlarındaki örneklerinin pik alanı ile belirli derişim aralığındaki değerler doğru orantılı olmalıdır. Doğrusallığın belirlenmesi için en az 5 farklı konsantrasyon ile çalışılmalıdır.

YBSK yönteminde kullanılacak olan BNZ'ye ait standart eğrinin bulunması amacıyla stok çözelti hazırlanmıştır. Tam olarak tartılmış 50 mg BNZ mobil faz ile yıkanarak balon jøjeye alınmış ve mobil faz ile 50 ml hacme tamamlandıktan sonra 10 dk ultrasonik banyoda tutulması ile 100 µg.ml⁻¹ sahip stok çözelti elde edilmiştir. Stok çözülden hareketle 50-500 µg.ml⁻¹ aralığında on farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Analiz sonucunda on nokta için BNZ derişimine karşılık gelen alan değeri saptanmıştır. Her test 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.1.2. Kesinlik

Analitik yöntemde kesinlik öngörülen koşullar altında, aynı numunenin çoklu örneklemede elde edilen bir dizi ölçüm arasında dağılma derecesini ifade eder. Tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik parametreleri ile belirlenir (ICH, 2005, s.10).

Tekrarlanabilirlik, kesinlik parametresini kısa bir zaman aralığında aynı çalışma koşulları altında ifade eder. Tekrarlanabilirliği tespit etmek için, aynı stok çözeltisi kullanılarak hazırlanan örneklerin alan ölçümü tekrarlanır. Bu işlem 3 farklı konsantrasyonun üçer kez ölçümü ile gerçekleştirilir.

Ara kesinlik laboratuvar içinde farklı günler, farklı analistler ve farklı donanımların analitik yöntemin kesinliği üzerindeki etkisini ifade eder. Birbiri ile ilişkisi bulunmayan durumların analitik yöntem üzerinde etkisi incelenir.

Tekrar elde edilebilirlik analiz ve deneylerin farklı laboratuvarlarda tekrarlandığında sonuçlar arasındaki kesinliğin gösterilmesidir. Yöntemin standardizasyonu için farklı kuruluşlar ile ortak çalışmalar yapılır.

Yöntemin kesinlik çalışmasında, tekrarlanabilirliğin gösterilmesi için kalibrasyon aralığına denk gelen 3 farklı konsantrasyonda (100 µg.ml⁻¹, 200 µg.ml⁻¹, 300 µg.ml⁻¹) BNZ çözeltisi hazırlanmış ve 3 gün boyunca 3 örnekle tekrarlanmıştır.

4.2.1.3. Doğruluk

Analitik validasyonda doğruluk parametresi, analitik yöntemin gerçek değer veya kabul edilmiş olan referans değere yakınlığını ifade eder. Analitik yöntemde, belirtilen aralık boyunca doğruluk oluşturulmalıdır. Genel olarak belirlenen aralığı kapsayan üç farklı konsantrasyon, en az üçer örnek olmak üzere ölçüm yapılır. Sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak hesaplanır.

Yapılan çalışmada doğruluğun belirlenebilmesi için 3 farklı konsantrasyonda (200 µg.ml⁻¹, 300 µg.ml⁻¹, 400 µg.ml⁻¹) BNZ içeren çözelti hazırlanmıştır. Her bir çözelti için 3 kez ölçüm tekrarlanmıştır.

4.2.1.4. Duyarlılık

Analitik yöntemlerde duyarlılık, numunede tespit edilebilen ancak kesin bir değer olarak verilemeyen en düşük analit miktarıdır. Saptama sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırı (LOQ) hesaplanarak değerlendirilir.

LOD, standart madde sinyalinin gürültüden ayrılabilmesi için gerekli olan en düşük madde konsantrasyonudur. Yöntemin aletli olup olmamasına bağlı olarak değer belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler arasında görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve elde edilen cevap ile eğimin standart sapması bulunmaktadır (ICH, 2005, s.11).

LOD değeri Denklem 4.1. yardımıyla hesaplanır (ICH, 2005, s.11).

$$LOD = \frac{3,3 \times SS}{m} \quad (4.1)$$

Denklem 4.1.'deki SS y eksenini kesim noktasının standart sapması, m ise korelasyon eşitliğinin eğimini ifade eder.

LOQ, analitik yöntemde standart maddenin miktarının güvenilir bir şekilde belirlenebildiği en düşük değeri ifade eder. LOD değerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler, LOQ için de uygulanabilir.

LOQ, uygun doğruluk ve kesinlik ile niceliksel olarak belirlenebilir. Bu değer Denklem 4.2. kullanılarak hesaplanır (ICH, 2005, s.12).

$$LOQ = \frac{10 \times SS}{m}$$

(4.2)

Denklem 4.2'deki SS y eksenini kesim noktasının standart sapması, m ise korelasyon eşitliğinin eğimidir.

4.2.1.5. Seçicilik

Seçicilik analitik yöntemin sadece amaçlanan maddeyi tespit edebilme yeteneğidir. Analiz, ortamda bulunan diğer maddelerden kaynaklanabilecek olan girişimden etkilenmemelidir. Seçicilik aynı zamanda örnek karışımının analizinde girişimin derecesinin de ölçüsüdür.

Yapılan çalışmada yöntem seçiciliği için etkin maddesiz analiz ve miktar tayininde kullanılan çözücüler kullanılmıştır. BNZ dışında diğer bileşenleri içeren sünger formülasyonlar hazırlanmış, miktar tayini çalışmasında kullanılan basamaklardan geçirilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan formülasyonlardaki diğer bileşenlerin girişiminin BNZ'nin seçiciliğine etkisi incelenmiştir.

4.3. KM'lerin Hazırlanması

BNZ yüklü PEG-kitosan, TPP-kitosan, NaOH-kitosan ve glutaraldehit-kitosan MS formülasyonları liyofilizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Farklı molekül ağırlıklarına sahip kitosanlar kullanılmış ve formülasyonlarda etkin madde miktar tayinine göre optimum formülasyon belirlenmiştir.

4.3.1. PEG-Kitosan MS'lerin hazırlanması

Etkin maddesiz formülasyonun hazırlanması amacıyla, farklı iki beherde kitosan ve PEG-kitosan karışımını %1'lik asetik asit çözeltisi içinde 100 rpm hızda 24 saat boyunca

manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. Daha sonra meydana gelen iki çözelti karıştırılmıştır. Etkin maddeli formülasyonun hazırlanması için tam olarak tartılmış farklı iki beherde kitosan ve PEG-kitosan karışımı %1'lik asetik asit çözeltisi içinde 200 rpm hızda 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. Çözünme işlemi bittikten sonra iki çözelti karıştırılmış ve BNZ eklenmiş ve 30 dk daha karıştırılmıştır. Liyofilizasyon işlemi için -20 °C'de 3 gün dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından formüller liyofilize edilmiştir (Parker vd., 2014, s.440).

Çizelge 4.2. PEG-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı

Kod	Kitosan (g)	PEG (g)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İK-1-Plasebo	1,5	0,5	-	200
İK-1	1,5	0,5	1,5	200

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

Çizelge 4.3. PEG-Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı

Kod	Kitosan (g)	PEG(g)	BNZ(%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İK-2-Plasebo	1,5	0,5	-	200
İK-2	1,5	0,5	1,5	200

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

Çizelge 4.4. PEG- Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı

Kod	Kitosan (g)	PEG(g)	BNZ(%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İK-3-Plasebo	1,5	0,5	-	200
İK-3	1,5	0,5	1,5	200

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

4.3.2. TPP-Kitosan MS'lerin hazırlanması

Etkin maddesiz formülasyonların hazırlanması için kitosan, %5'lik asetik asit çözeltisi içinde 300 rpm hızda tamamen çözünene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra TPP çözeltisi damla damla kitosan çözeltisine ilave edilmiştir. Meydana gelen karışım TPP çözeltisinin uzaklaştırılması amacıyla 2-3 kere distile su ile yıkanmış ve santrifüj edilmiştir. Etkin maddeli formülasyonun hazırlanması için kitosan %5'lik asetik asit çözeltisi içinde 300 rpm hızda tamamen çözünene kadar karıştırılmıştır. Kitosan tamamen çözündükten sonra çözeltiye BNZ eklenmiştir. Yeterli miktarda TPP çözeltisi eklenmiş ve daha sonra TPP çözeltisinin

uzaklaştırılması için distile su ile 2-3 kez yıkandıktan sonra formülasyon santrifüj edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi için -20°C’de 3 gün dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından formüller liyofilize edilmiştir.

Çizelge 4.5. *TPP-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı*

Kod	Kitosan (g)	TPP Çözeltisi (ml)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İB-1-Plasebo	2	100	-	100
İB-1	2	100	15	100

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

Çizelge 4.6. *TPP-Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı*

Kod	Kitosan (g)	TPP Çözeltisi (ml)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İB-2-Plasebo	2	100	-	100
İB-2	2	100	15	100

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

Çizelge 4.7. *TPP-Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı*

Kod	Kitosan (g)	TPP Çözeltisi (ml)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İB-3-Plasebo	2	100	-	100
İB-3	2	100	15	100

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

4.3.3. NaOH-Kitosan MS’lerin hazırlanması

Etkin maddesiz formülasyonların hazırlanması için kitosan, %2’lik asetik asit çözeltisinde 300 rpm hızda tamamen çözünene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra NaOH çözeltisi damla damla kitosan çözeltisine ilave edilmiştir. Meydana gelen karışım distile su ile 2-3 kez yıkandıktan sonra santrifüj edilmiştir. Etkin maddeli formülasyonların hazırlanması için kitosan %2’lik asetik asit çözeltisi içinde 300 rpm hızda tamamen çözününceye kadar karıştırılmıştır. Damla damla NaOH çözeltisi ve BNZ eklenmiştir. Meydana gelen karışım distile su ile 2-3 kez yıkanmış ve santrifüj edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi için -20 °C’de 3 gün dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından formüller liyofilize edilmiştir.

Çizelge 4.8. NaOH-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı

Kod	Kitosan(g)	NaOH Çözeltisi (ml)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İS-1-Plasebo	2	50	-	60
İS-1	2	50	15	60

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

Çizelge 4.9. NaOH -Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı

Kod	Kitosan(g)	NaOH Çözeltisi (ml)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İS-2-Plasebo	2	50	-	60
İS-2	2	50	15	60

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

Çizelge 4.10. NaOH-Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı

Kod	Kitosan(g)	NaOH Çözeltisi (ml)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İS-3-Plasebo	2	50	-	60
İS-3	2	50	15	60

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

4.3.4. Glutaraldehit-Kitosan MS'lerin hazırlanması

Etkin maddesiz formülasyon için kitosan, %1,2'lik asetik asit çözeltisinde tamamen çözününceye kadar 300 rpm hızda karıştırılmıştır. Çözünme tamamlandıktan sonra %5'lik glutaraldehit çözeltisi eklenmiş ve 30 dk boyunca karışımdaki hava baloncukları uzaklaşana dek ultrasonik banyoda tutulmuştur. Bu işlemden sonra 36 saat boyunca 40 °C su banyosunda ve daha sonra 2 saat boyunca -40 °C'de bekletilmiştir. Çözücü 0.5 mol/l amonyum hidroksit çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Distile su ile 2-3 kez yıkanarak nötralize edilmiştir. Nötralizasyon işleminden sonra 2 gün -45 °C'de dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir. Etkin maddeli formülasyon için kitosan %1,2'lik asetik asit çözeltisinde tamamen çözününceye kadar 300 rpm hızda karıştırılmıştır. Çözünme tamamlandıktan sonra %5'lik glutaraldehit çözeltisi eklenmiş ve 30 dk boyunca karışımdaki hava baloncukları uzaklaşana dek ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra BNZ karışıma eklenmiştir. 36 saat boyunca 40 °C su banyosunda ve daha sonra 2 saat boyunca -40 °C'de bekletilmiştir. Çözücü 0.5 mol/l amonyum hidroksit çözeltisi ile birkaç kez yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Distile su ile 2-3 kez yıkanarak nötralize edilmiştir. Nötralizasyon işleminden sonra 2 gün -45 °C'de dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir (Bai vd., 2018, s.256).

Çizelge 4.11. *Glutaraldehit-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı*

Kod	Kitosan(g)	Glutaraldehit Çözeltisi (ml)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İG-1-Plasebo	1	10	-	90
İG-1	1	10	15	90

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

Çizelge 4.12. *Glutaraldehit -Orta molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı*

Kod	Kitosan(g)	Glutaraldehit Çözeltisi (ml)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İG-2-Plasebo	1	10	-	90
İG-2	1	10	15	90

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

Çizelge 4.13. *Glutaraldehit -Düşük molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan MS formülasyonunun içerik oranı*

Kod	Kitosan(g)	Glutaraldehit Çözeltisi (ml)	BNZ (%)	Asetik Asit Çözeltisi (ml)
İG-3-Plasebo	1	10	-	90
İG-3	1	10	15	90

Plasebo, etkin maddesiz formülasyon

4.4. Kitosan MS Karakterizasyon Çalışmaları

4.4.1. Termal analiz

KM formülasyonunun termal analizi DSC (Schimadzu DSC-60, Japonya) cihazı ile basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabı, 50 ml.dk⁻¹ azot gazı akış hızı ve 30-300°C aralığında, 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artışı kullanılarak alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

4.4.2. X-ışını kırınımı

KM formülasyonunun XRD analizinde 5-40° aralığında, 40 kV voltaj, 15 mA akım şiddeti, 2θ açısı ve 2° dk⁻¹ ilerleme hızında, Rikagu jeneratör kullanılmıştır.

4.4.3. FT-IR

KM formülasyonunun IR analizi FT-IR (Schimadzu IR Prestige, Japonya) cihazı kullanılarak, 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

4.4.4. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

KM formülasyonunun parçacık şekli ve yüzey özelliği karbon bandı üzerine yayılarak SEM (Zeiss Ultra Plus Fesem, Almanya) cihazı ile belirlenmiştir.

4.4.5. Formülasyonda etkin madde miktar tayini

Hazırlanan KM formülasyonunda etkin madde miktar tayini 'Benzidamin HCl miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi' bölümünde anlatıldığı gibi belirlenmiştir.

Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile hazırlanan KM formülasyonu içindeki BNZ miktarını belirlemek için tam olarak tartılmış olan formülasyon 20 ml su içinde gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra 0,45 µm filtreden süzölmüştür. (El-laithy vd., 2015, s.163). Elde edilen çözelti mobil faz ile gerekli oranlarda seyreltilerek içerdiği etkin madde miktar tayini yapılmıştır. Deney 3 kez tekrarlanmıştır.

4.4.6. *In vitro* salım çalışması

BNZ'nin KM formülasyonundan salım çalışması için *sink* koşullarda, 50 ml PBS (pH 7.4), $37 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 100 rpm karıştırma hızında yapılmıştır. Tam tartılmış etkin madde selüloz asetat membrana konduktan sonra 1 ml salım ortamı eklenmiş ve sızdırmayacak şekilde kapatılmıştır. BNZ içeren KM formülasyonları ise dissolüsyon cihazının sepet aparatına yerleştirilmiştir. Hazırlanan sistemler $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de ve 100 rpm'de sürekli karışan salım ortamı içeren reseptör kompartımanına alınmıştır. Reseptör kompartımandan salım ortamının buharlaşmasını engellemek amacıyla, salım ortamı dikkatlice kapatılmıştır. 15. dk, 30. dk, 1. saat, 2. saat, 6. saat 18. saat ve 24. saatte reseptör kompartımanından 1 ml hacimde örnek alınmış ve eksilen miktar salım ortamı ile tamamlanmıştır. Örneklerdeki BNZ miktarı 'Benzidamin HCl miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi' bölümünde anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Farklı zamanlarda salınan BNZ konsantrasyonu kullanılarak hesaplanan % kümülatif BNZ salımı zamana karşı grafiğe geçirilerek salım profili oluşturulmuştur. Salım için deney 3 kez tekrarlanmıştır.

4.4.7. Şişme indisi tayini

Hazırlanan KM'lerin şişme indislerinin tayini için tam olarak tartılmış (A_1) üç farklı KM örneği %2 agar çözeltisine daldırılmış ve $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. 8 saat boyunca 2 saatlik aralıklarla örnekler çözeltiler içinden çıkarılmış ve fazla yüzey suları filtre kağıdı ile alınmıştır. 8 saat sonunda süngerler tekrar tartılmış (A_2) ve denklem yardımı ile şişme indisleri hesaplanmıştır (Kasseem, ElMeshad ve Fares, 2015, s.539).

$$\text{Şişme indisi} = (A_2 - A_1) / A_1 \quad (4.3)$$

4.4.8. Yüzey pH ölçümü

Hazırlanan KM'lerin yüzey pH değerinin belirlenmesi için, süngerler oda sıcaklığında 2 saat boyunca 2 ml tükürük sıvısı (pH 6.8) ile temas ettirilmiştir. Şişmesi sağlanan KM'ler pH ölçümü için pH metrenin elektrodu ile temas ettirilmiş ve 1 dakika boyunca dengelenmesi sağlanmıştır. Cihaz denge durumuna ulaştıktan sonra ölçüm yapılmıştır (Kasseem, El-Meshad ve Fares, 2015, s.539). Deney 3 kez tekrarlanmıştır.

Kararlılık çalışması

Hazırlanan KM formülasyonunun kararlılık çalışması kapsamında formülasyonlar $4\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, $40\pm 1^\circ\text{C}$ 'lik kararlılık kabinlerine yerleştirilmiştir. Formülasyonun kararlılık testi belirli periyotlarda (0. zaman, 1. ay, 3. ay) tekrarlanmıştır. Formülasyonlarda fiziksel görünüş, etkin madde miktar tayini, şişme indisi tayini ve yüzey pH ölçümü yapılmıştır.

Farmakokinetik salım çalışması

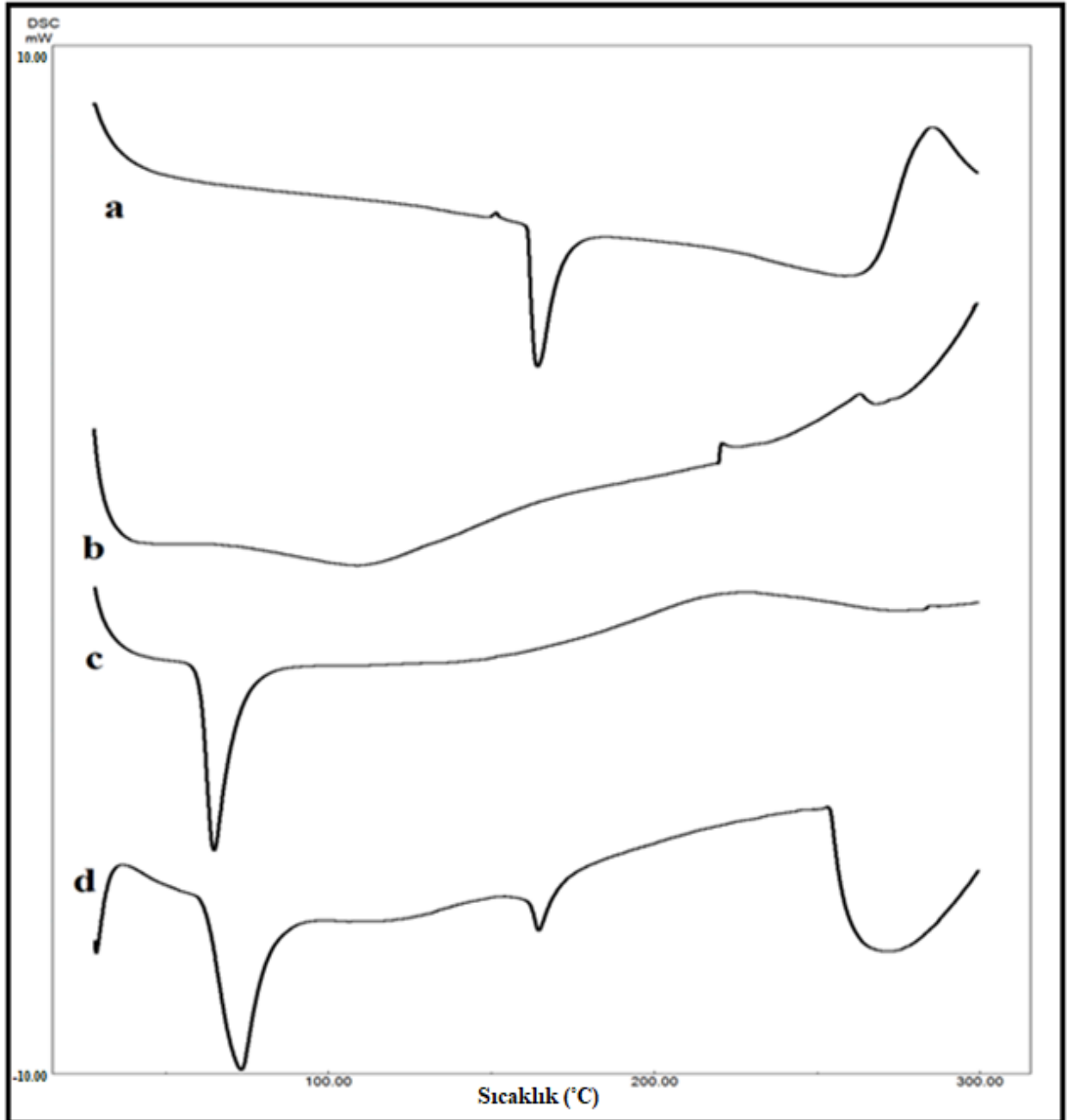
Hazırlanan KM formülasyonu için salım verileri farklı kinetik modellere (Sıfırıncı derece kinetik, birinci derece kinetik, Higuchi, Hixson-Crowell, Hopfenberg, Korsmeyer-Peppas ve Baker-Lansdale) uygulanmıştır. En uygun kinetik modelin seçimi amacıyla hız sabiti (k), determinasyon katsayısı (r^2) ve Akaike bilgi kriteri (AIC) incelenmiştir.

5. BULGULAR

5.1. Benzidamin HCl ve Yardımcı Maddeler ile Yapılan Çalışmalar

5.1.1. Termal analiz

BNZ ve yardımcı maddelere ait termogramlar Şekil 5.1.'de sunulmuştur. BNZ ait spesifik endotermik pik 162°C'de gözlenmiştir.



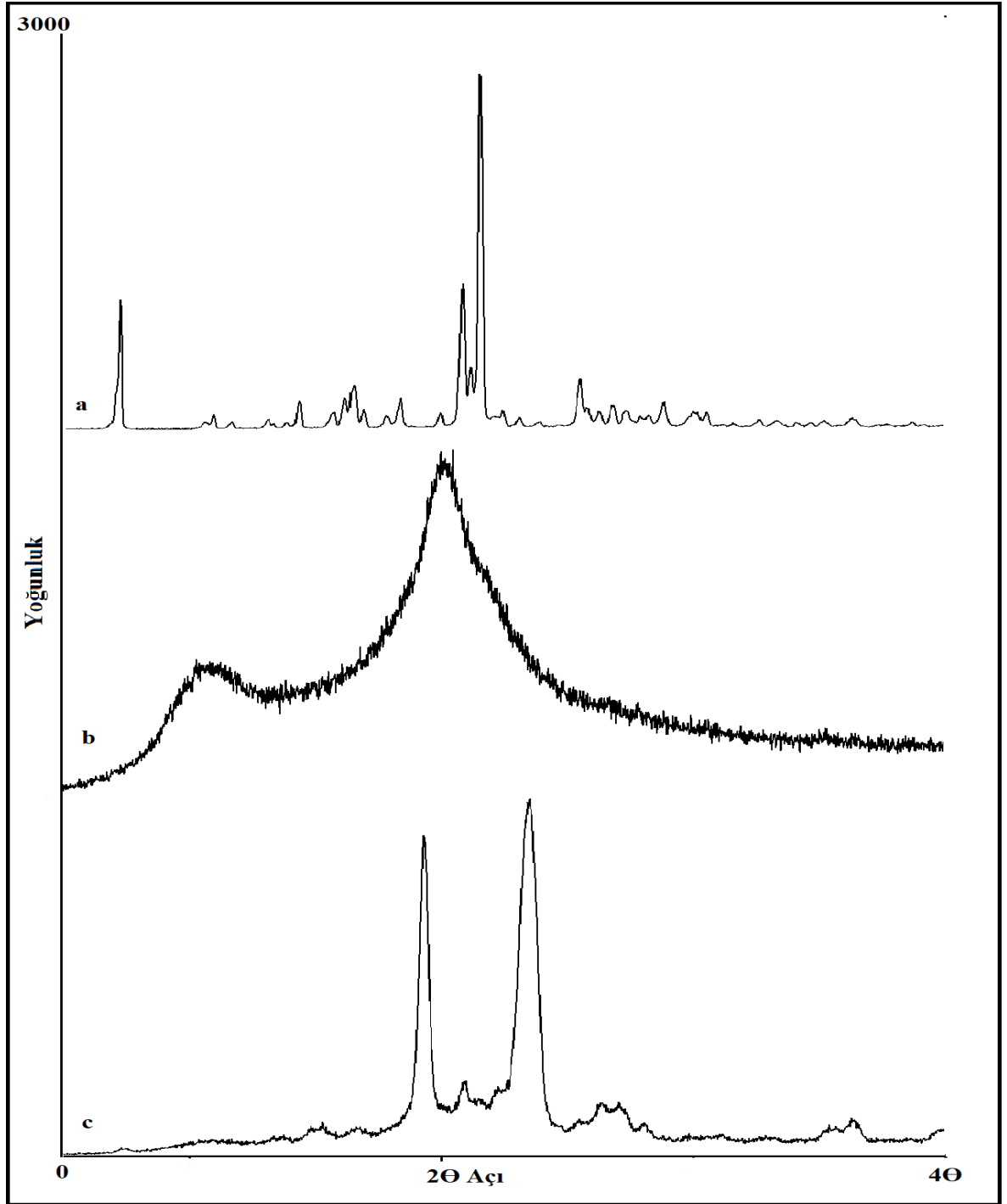
Şekil 5.1. BNZ ve yardımcı maddelerin termogramı

a: BNZ, b: Yüksek molekül ağırlıklı kitosan, c: PEG,

d: BNZ-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan-PEG fiziksel karışımı

5.1.2. X-ışını kırınımı

BNZ ve yardımcı maddelere ait X-ışını kırınım profilleri Şekil 5.2.'de sunulmuştur.



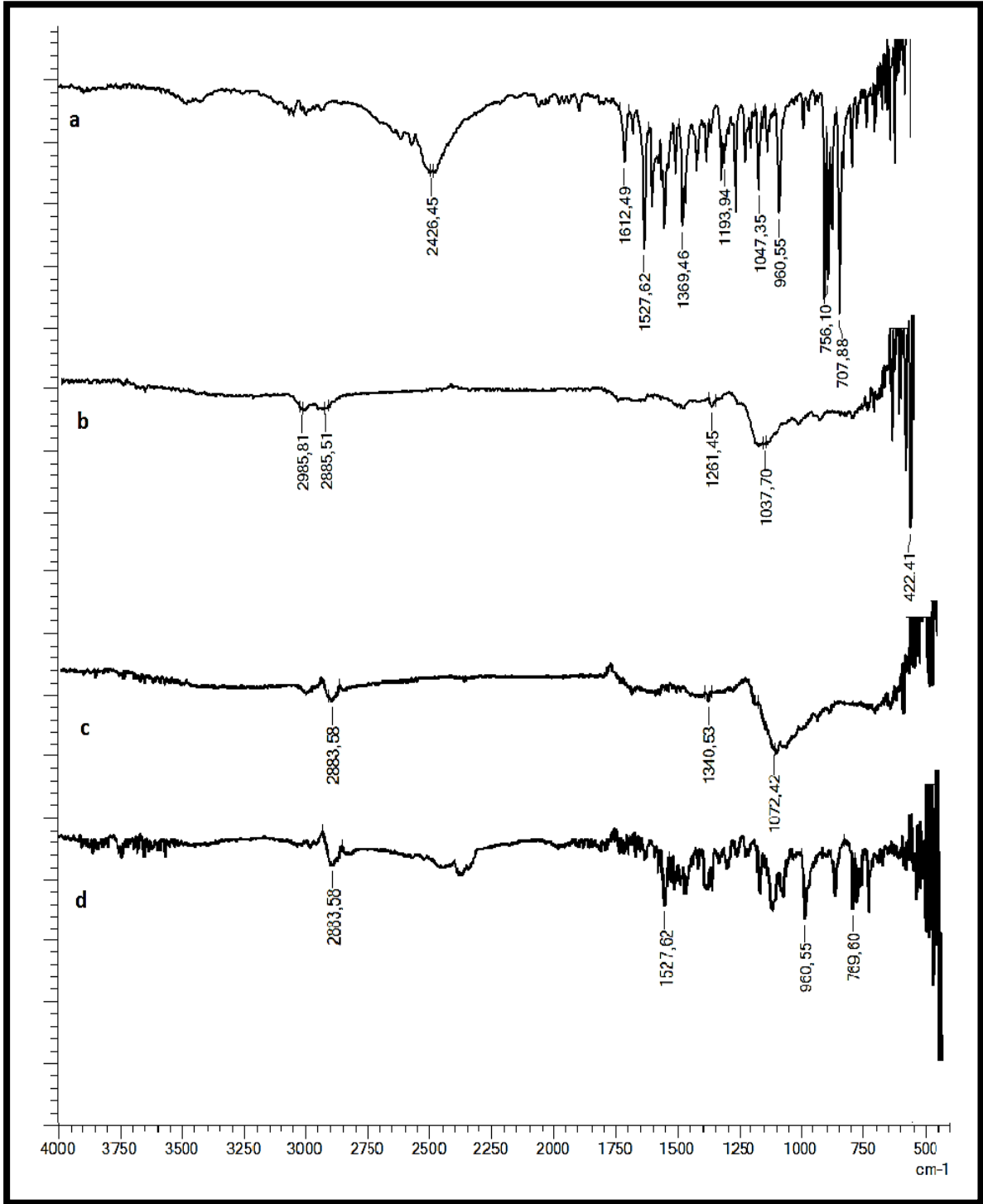
Şekil 5.2. BNZ ve yardımcı maddelerin X-ışını kırınım profili

a: BNZ, *b:* Yüksek molekül ağırlıklı kitosan,

c: BNZ-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan-PEG fiziksel karışımı

5.1.3. FT-IR

BNZ ve yardımcı maddelere ait FT-IR spektrumları Şekil 5.3.'de sunulmuştur.



Şekil 5.3. BNZ ve yardımcı maddelere ait FT-IR spektrumu

a: BNZ, b: yüksek molekül ağırlıklı kitosan, c: Yüksek molekül ağırlıklı kitosan + PEG,

d: Yüksek molekül ağırlıklı kitosan + PEG + BNZ

5.2. Benzidamin HCl Miktar Tayini İçin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

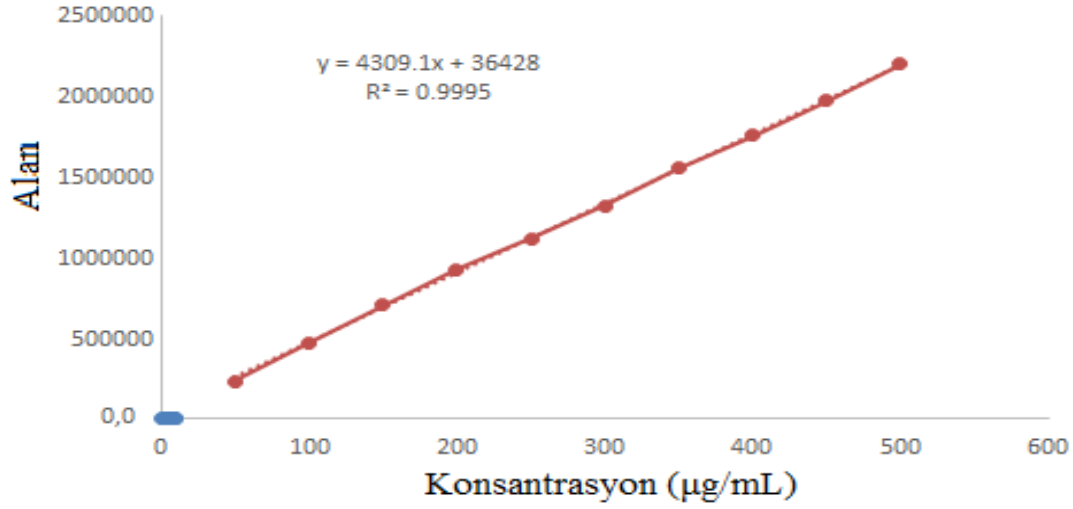
BNZ için validasyon çalışmasından elde edilen sonuçlar doğruluk, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik başlıkları altında değerlendirilmiştir.

5.2.1. Doğrusallık

50-500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ konsantrasyon aralığında 10 farklı konsantrasyonda 3 kalibrasyon seti hazırlanmış ve YBSK ile analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen alan değerleri Çizelge 5.1.'de sunulmuştur. Alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğruluk eşitliği Şekil 5.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 5.1. Doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler ve alan değerler (n=3)

BNZ ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	Alan Değerleri			
	1.Seri	2.Seri	3.Seri	Ortalama
50	224832,1804	240186,4045	219092,2049	228036,9299
100	465885,5031	476049,0073	460852,8123	467595,7742
150	734141,4608	687411,2585	685229,6775	702260,7989
200	946349,8595	918126,9099	902084,3677	922187,0457
250	1127014,6699	1113931,8161	1093313,0623	1111419,8494
300	1339463,7178	1322182,5960	1292777,1573	1318141,1570
350	1570798,1977	1532590,4874	1540951,9615	1548113,5489
400	1817411,3547	1712289,0320	1728108,3802	1752602,9223
450	2036140,6980	1933004,0909	1934484,0857	1967876,2915
500	2256659,1159	2168651,8924	2162697,9890	2196002,9991



Şekil 5.4. BNZ'nin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi'ne ait standart eğri ve doğrusallık eşitliği (n=3)

5.2.2. Kesinlik

BNZ'nin 100, 200, 300 µg.ml⁻¹ konsantrasyon 3 farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için 3 kez tekrar art arda 3 gün yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen eşitlik ile hesaplanmış ve bilinen konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir. Kesinlik için kabuledilebilirlik sınırı varyasyon katsayısının %2'den düşük olmasıdır. Kesinlik çalışmasının sonuçları Çizelge 5.2., .5.3. ve 5.4.'te sunulmuştur. Bulguların kabuledilebilirlik sınırı içinde olması kullanılan yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır.

Çizelge 5.2. 100 µg.ml⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları

100 µg.ml ⁻¹			
	1.Gün (Alan)	2.Gün (Alan)	3.Gün (Alan)
	5311557	5391649	5328134
	5241018	5460932	5257367
	5371926	5268414	5247979
	1.Gün (konsantrasyon)	2.Gün (konsantrasyon)	3.Gün (konsantrasyon)
	101,5546	102,9053	102,2933
	99,9389	104,8000	100,9694
	102,5968	100,9246	101,1179
Ortalama	101,3634	102,8766	101,4602
Standart Hata	1,3392	1,9378	0,7253

Çizelge 5.2. 100 µg.ml⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları (Devamı)

Varyasyon Katsayısı	1,3212	1,8836	0,7149
%95 Güven Aralığı	3,3268	4,8138	1,8017

Çizelge 5.3. 200 µg.ml⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları

200 µg.ml ⁻¹			
	1.Gün (Alan)	2.Gün (Alan)	3.Gün (Alan)
	10004051	10038258	10031600
	10029144	10146960	10052365
	10054549	10067475	10020307
	1.Gün (konsantrasyon)	2.Gün (konsantrasyon)	3.Gün (konsantrasyon)
	200,815	200,5505	201,8648
	200,6046	203,4793	202,4908
	201,0025	202,6170	202,3518
Ortalama	200,8074	202,2156	202,2358
Standart Hata	0,4619	1,5051	0,3287
Varyasyon Katsayısı	0,2303	0,7443	0,1625
%95 Güven Aralığı	1,1474	3,7388	0,8165

Çizelge 5.4. 300 µg.ml⁻¹ konsantrasyon için kesinlik sonuçları

300 µg.ml ⁻¹			
	1.Gün (Alan)	2.Gün (Alan)	3.Gün (Alan)
	14654408	14805185	14672741
	14936383	14738859	14664917
	14830178	14676043	14577884
	1.Gün (konsantrasyon)	2.Gün (konsantrasyon)	3.Gün (konsantrasyon)
	299,1739	302,1980	301,4369
	304,7532	301,7886	302,0063
	302,9200	300,9154	300,5584
Ortalama	302,2824	301,634	301,3339
Standart Hata	2,8438	0,6551	0,7294
Varyasyon Katsayısı	0,9408	0,2172	0,2421
%95 Güven Aralığı	7,0643	1,6275	1,8120

5.2.3. Doğruluk

BNZ için yapılan validasyon çalışmasında doğruluğun belirlenebilmesi amacıyla 3 farklı konsantrasyonda ($200 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $300 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $400 \mu\text{g.ml}^{-1}$) BNZ içeren stok çözelti hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 tekrar analizi yapılmıştır. Elde edilen konsantrasyon değerleri doğrusalılık çalışmasında elde edilen eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve bilinen konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak analitik yöntemin doğruluğu % geri kazanım olarak hesaplanmıştır. Doğruluk çalışması için kabuledilebilirlik sınırı %98-102 (\pm %2) aralığıdır. Yöntemin geri kazanım ve doğruluğu sonuçlara göre kanıtlanmıştır. Doğruluk çalışmasının sonuçları Çizelge 5.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.5. BNZ'nin YBSK ile elde edilen doğruluk değerleri (n=3)

Eklenen konsantrasyon			
	200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Elde edilen alan	9931175	14799770	19258650
	10096854	14866174	19328440
	10076541	14631196	19026996
Bulunan konsantrasyon	200,4387	303,4102	403,5793
	204,5027	307,1017	405,6069
	203,8813	302,1140	399,0364
% Geri kazanım	101,4705	101,1637	100,8948
	102,2535	102,3672	101,4017
	101,9401	100,7047	99,7660
Ortalama % Geri Kazanım	101,8880	101,4029	100,6875
Standart Hata	0,4468	0,3522	0,3434
Varyasyon Katsayısı	1,0787	0,8507	0,8354
%95 Güven Aralığı	2,7190	2,1429	2,0895

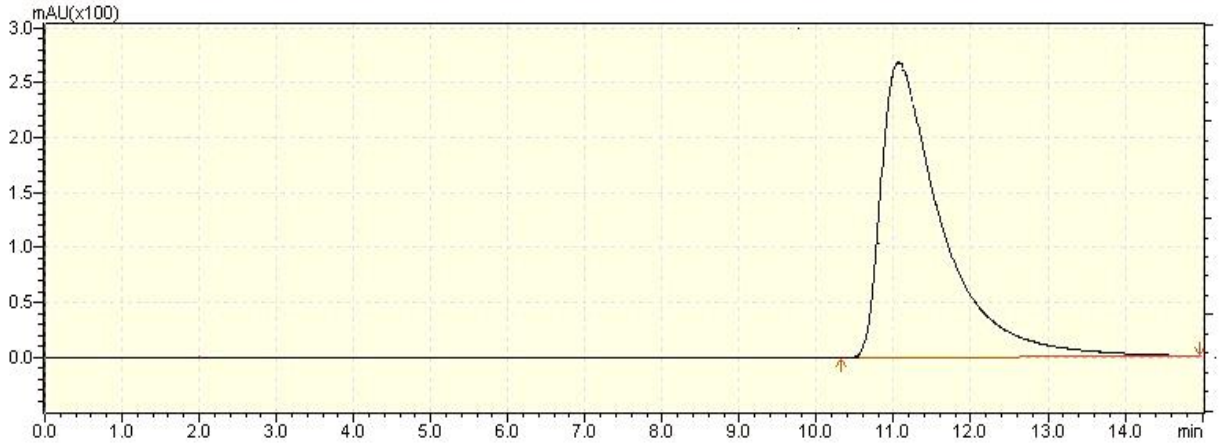
5.2.4. Duyarlılık

LOD ve LOQ değerleri "4.2.1.4. Duyarlılık" bölümünde söz edilen Denklem 4.1. ve Denklem 4.2. ile hesaplanmış ve sırasıyla $9,8435 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ve $29,8287 \mu\text{g.ml}^{-1}$ olduğu bulunmuştur.

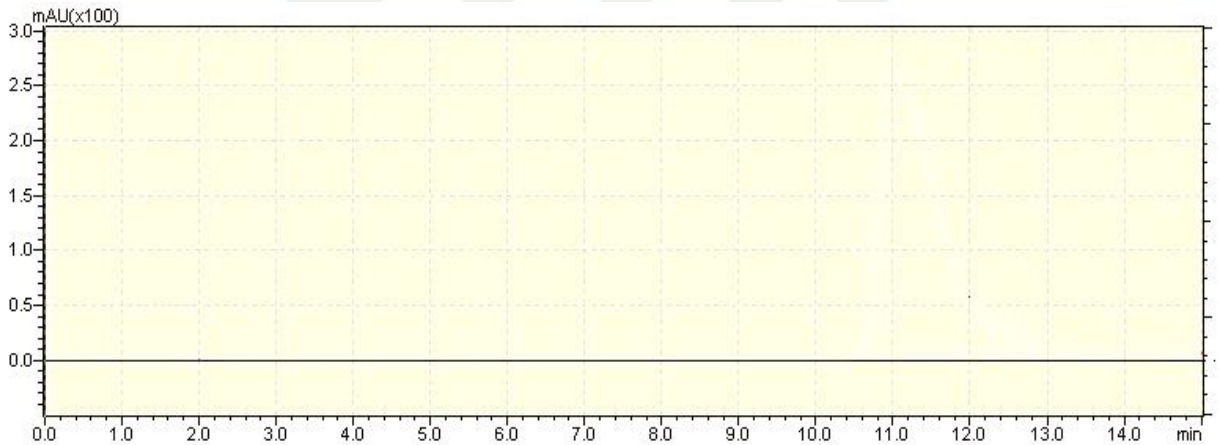
Kullanılan analitik yöntemin duyarlılığı için kabuledilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen en küçük konsantrasyon $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ olup hesaplanan LOD ve LOQ değerlerin bu değer altında bulunmuştur. Sonuçlar yöntemin duyarlılığını kanıtlamaktadır.

5.2.5. Seçicilik

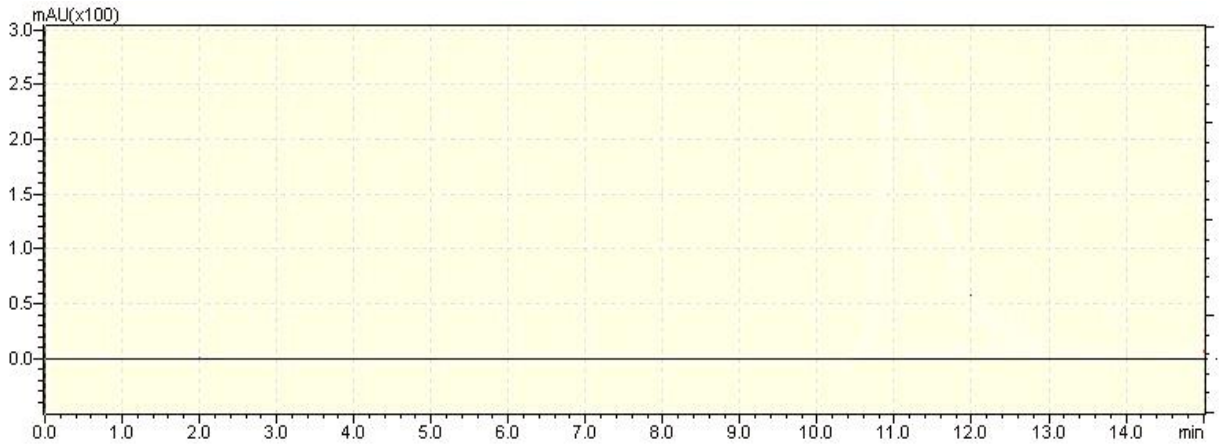
Seçicilik çalışması için BNZ, mobil faz ve İK-Plasebo'ya için elde kromatogramlar sırasıyla Şekil 5.5., Şekil 5.6., Şekil 5.7.'de sunulmuştur. Elde edilen kromatogramlar BNZ'nin iyi biçimde ayrıldığını göstermektedir.



Şekil 5.5. BNZ'ye ait YBSK kromatogramı



Şekil 5.6. Mobil faza ait YBSK kromatogramı



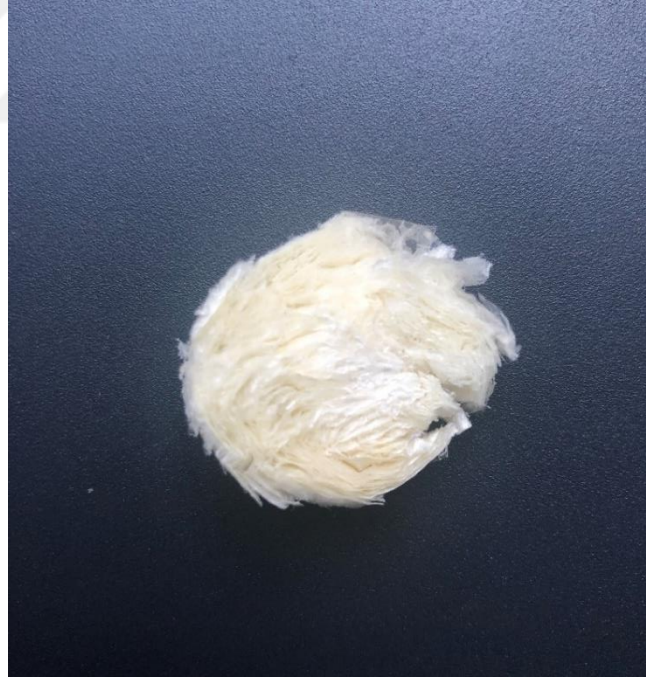
Şekil 5.7. İK-Plasebo'ya ait YBSK kromatogramı

5.3. MS Özelliklerine Ait Çalışma

Yapılan çalışmalar sonucunda “4.3.3. NaOH-Kitosan MS’lerin hazırlanması” bölümünde anlatılan yöntemle KM elde edilemediğinden İS-1, İS-2 ve İS-3 formülasyonları çalışmanın devamında kullanılamamıştır.

“4.3.2. TPP-Kitosan MS’lerin hazırlanması” ve “4.3.4. Glutaraldehit-Kitosan MS’lerin hazırlanması” bölümlerinde anlatılan hazırlama yöntemleri ile elde edilen İB-1, İB-2 ve İB-3 ve İG-1, İG-2 ve İG-3 formülasyonları tez çalışmasının amacı olan diş çekim bölgesindeki enflamasyonun tedavisi için sert ve kırılabilir yapıda olduğundan çalışmanın devamında incelenmemiştir.

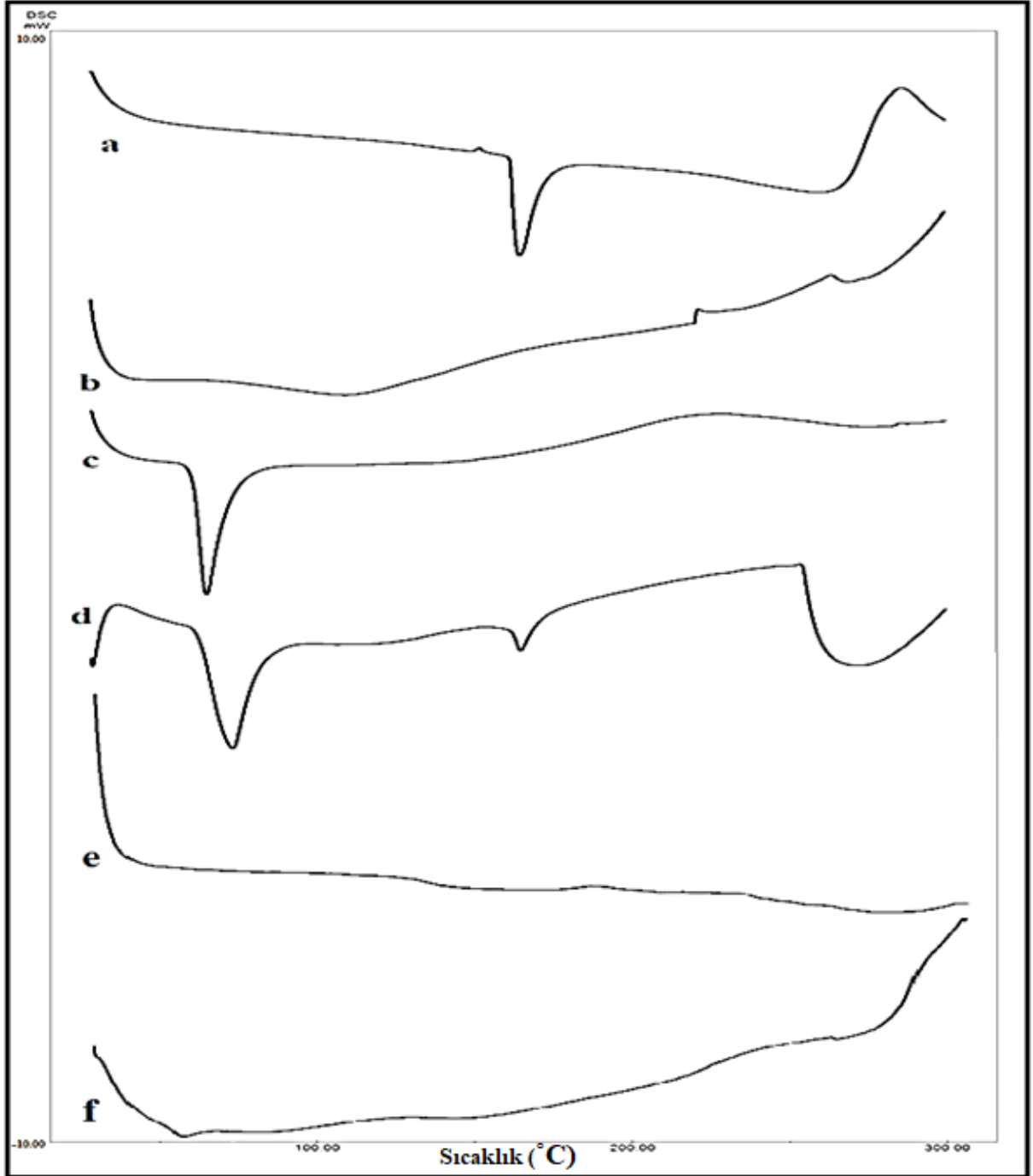
“4.3.1. PEG-Kitosan MS’lerin hazırlanması” bölümünde anlatılan yöntemle İK-1, İK-2 ve İK-3 formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar arasında optimum formülasyonun seçilebilmesi amacıyla yapılan yüzey pH ölçümlerinde İK-2 ve İK-3 formülasyonlarının pH değeri çalışmanın amacı için uygun aralıkta olmadığından optimum formülasyon olarak yüzey pH değeri uygun olan İK-1 formülasyonu seçilmiştir.



Görsel 5.1. PEG-Yüksek molekül ağırlıklı KM (İK-1)

5.3.1. Termal analiz

Etkin maddesiz ve etkin madde içeren KM formülasyonunun termogramları BNZ ve KS ile karşılaştırmalı olarak Şekil 5.8.'de sunulmuştur.

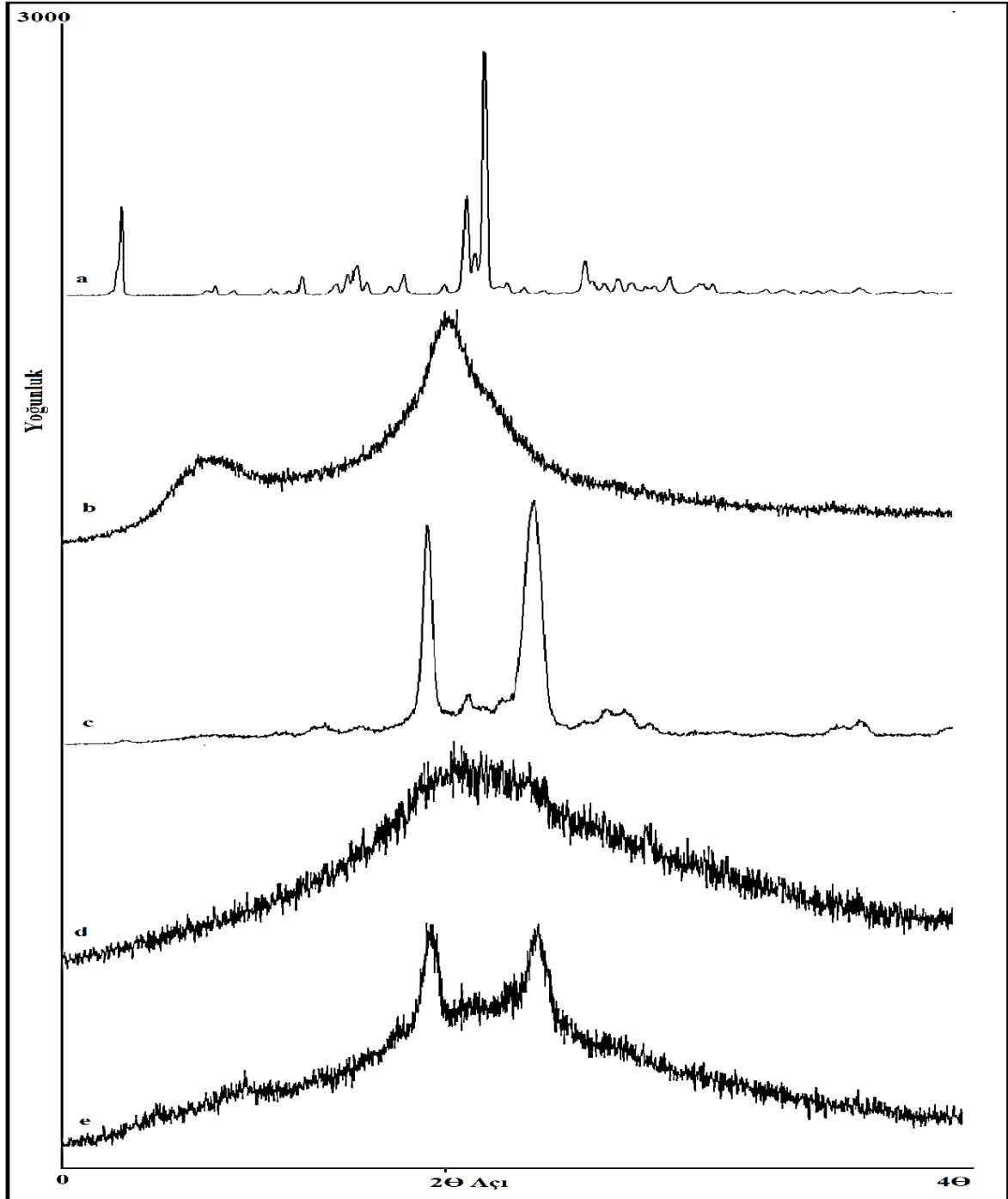


Şekil 5.8. Etkin maddeli/Maddesiz hazırlanan MS formülasyonlarının termogramı

a: BNZ, b: Yüksek molekül ağırlıklı kitosan, c: PEG, d: BNZ-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan-PEG fiziksel karışımı, e: İK-Plasebo, f: İK-1

5.3.2. X- ışını kırınımı

Etkin maddeli ve etkin maddesiz olarak hazırlanmış KM formülasyonlarının X-ışını kırınım profilleri BNZ ve KS ile karşılaştırılmalı olarak Şekil 5.9.'da sunulmuştur.

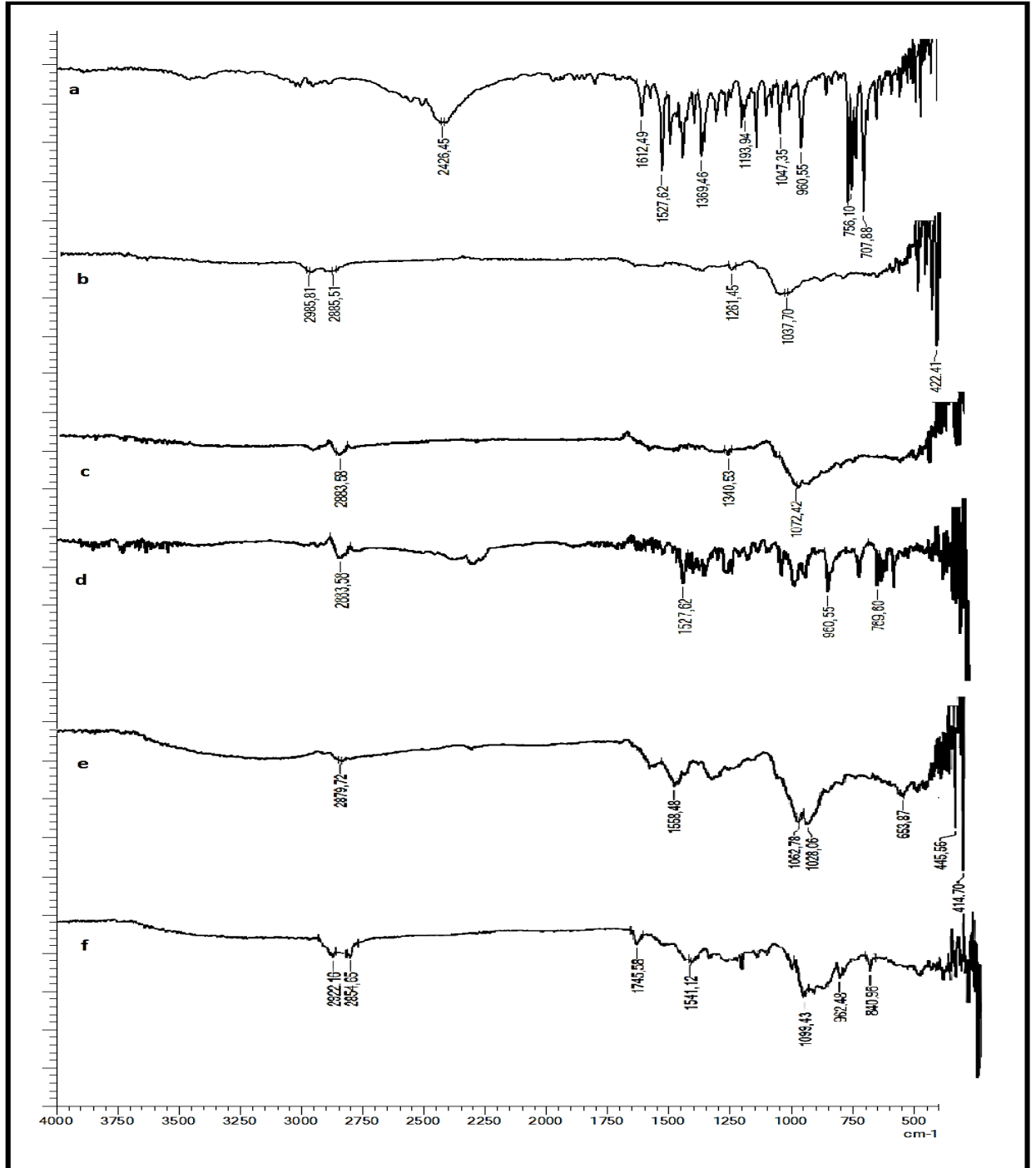


Şekil 5.9. Etkin maddeli/maddesiz MS formülasyonunun X-ışını kırınım profili

a: BNZ, b: Yüksek molekül ağırlıklı kitosan, c: BNZ-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan-PEG fiziksel karışımı,
d: İK-Plasebo, e: İK-1

5.3.3. FT-IR

Etkin maddeli ve etkin maddesiz KM formülasyonlarının FT-IR spektrumları BNZ, KS ve fiziksel karışım ile karşılaştırılmalı olarak Şekil 5.10.'da sunulmuştur.

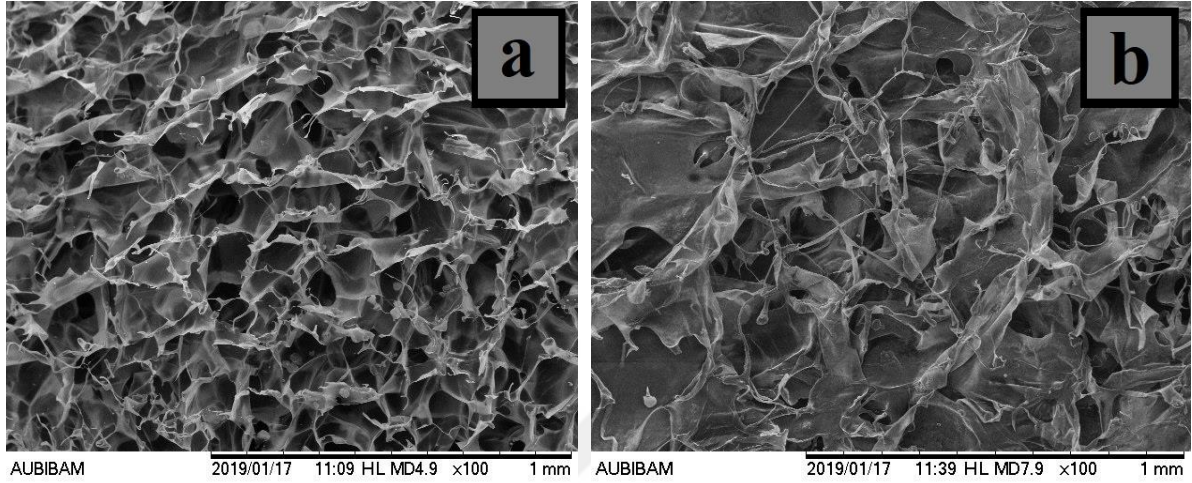


Şekil 5.10. Etkin maddeli/maddesiz MS formülasyonunun FT-IR spektrumu

a: BNZ, b: Yüksek molekül ağırlıklı kitosan, c: Yüksek molekül ağırlıklı kitosan-PEG d: BNZ-Yüksek molekül ağırlıklı kitosan-PEG fiziksel karışımı, e: İK-Plasebo, f: İK-1

5.3.4. Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

Yüksek molekül ağırlığına sahip kitosan ile hazırlanan etkin madde içermeyen plasebo formülasyonun ve etkin madde içeren taze hazırlanmış formülasyonların SEM görüntüsü Görsel 5.2.'de sunulmuştur.



Görsel 5.2. Etkin Maddeli ve etkin maddesiz hazırlanan KM formülasyonunun SEM görüntüsü

a: İK-Plasebo x100, b: İK-1, x100

5.3.5. Formülasyonda etkin madde miktar tayini

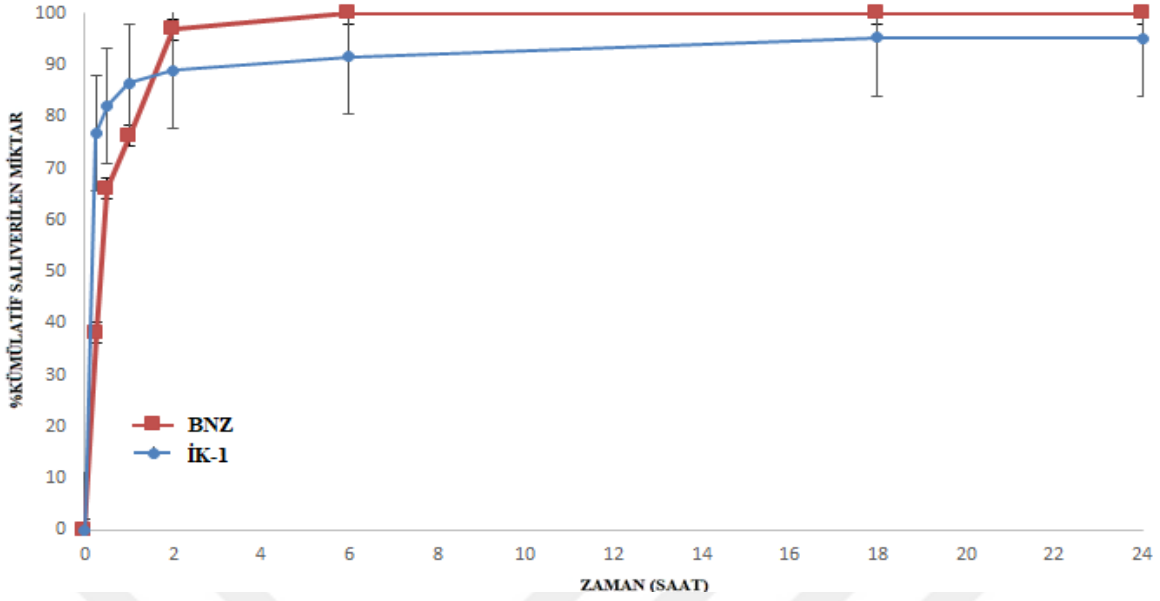
Formülasyondaki etkin madde miktar tayini “4.4.5. Formülasyonda etkin madde miktar tayini” bölümünde verilen yöntem belirlenmiş ve sonuçlar Çizelde 5.6.’da sunulmuştur.

Çizelge 5.6. İK-1 formülasyonunda etkin madde miktarı (n=3)

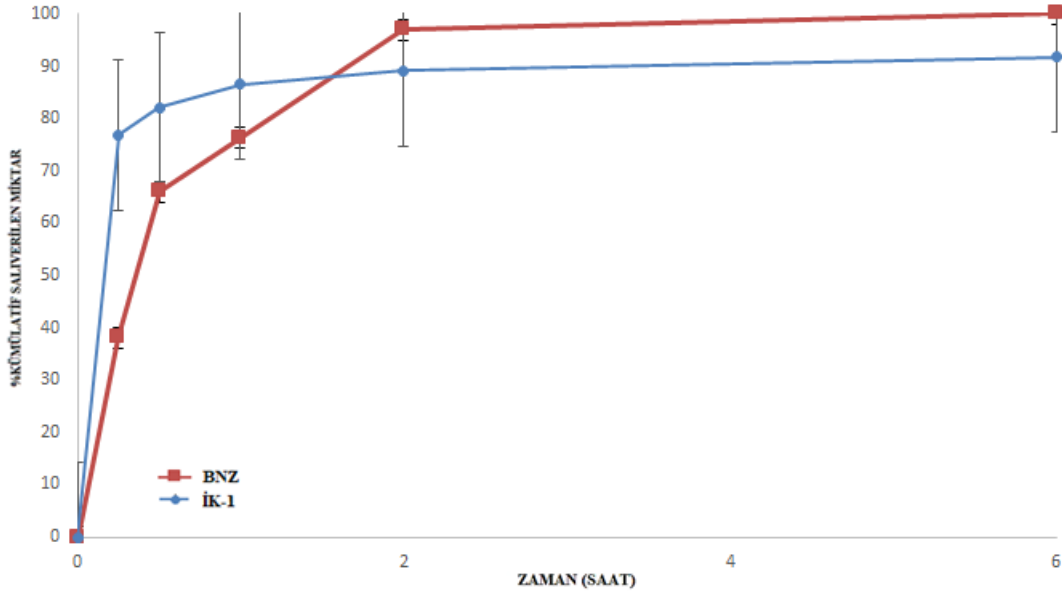
Formülasyon Kodu	Etkin madde miktarı (mg)
İK-1	1,499±0,06

5.3.6. *In vitro* salım çalışması

Elde edilen veriler kullanılarak İK-1 formülasyonu ve saf etkin maddeye (BNZ) ait *in vitro* salım profilleri Şekil 5.11.’de sunulmuştur.



Şekil 5.11. İK-1 formülasyonuna ait in vitro salım profili



Şekil 5.12. İK-1 formülasyonunun ilk 6 saatine ait in vitro salım profili

5.3.7. Şişme indisi tayini

KM'lerin şişme indisi tayini için yapılan çalışma sonuçları Çizelge 5.7.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.7. İK-1 formülasyonunun şişme indisi (n=3)

Formülasyon kodu	Başlangıç ağırlığı (g) ±SH	Son ağırlık (g) ±SH	Şişme İndisi±SH
İK-1	0,338 ± 0,001	6,323 ± 0,353	17,767 ± 1,059

5.3.8. Yüzey pH ölçümü

KS'lerin yüzey pH ölçümü için yapılan çalışma sonuçları Çizelge 5.8.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.8. İK-1 formülasyonunun yüzey pH değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	Yüzey pH değeri ± SH
İK-1	6,60±0,040

Kararlılık çalışması

4°C, 25° ve 40°C'de saklanan KM'lerin 1. ay ve 3. ay sonundaki etkin madde miktar tayini, yüzey pH ölçümü ve şişme indisi 0. zamana ait etkin madde miktar tayini, yüzey pH ölçümü ve şişme indisi analizleri ile karşılaştırılmalı olarak Çizelge 5.9., Çizelge 5.10 ve Çizelge 5.11.'de verilmiştir.

Çizelge 5.9. Kararlılık çalışması etkin madde miktarı sonuçları (n=3)

Formülasyon kodu	Etkin madde miktarı (mg)	Etkin madde miktarı (mg)	Etkin madde miktarı (mg)
	±SH 4°C	±SH 25°C	±SH 40°C
İK-1 0. Ay	1,499 ± 0,06	1,499 ± 0,06	1,499 ± 0,06
İK-1 1. Ay	1,488 ± 0,12	1,478 ± 0,08	1,66 ± 0,02
İK-1 3. Ay	1,476 ± 0,07	1,476 ± 0,04	1,78 ± 0,03

Çizelge 5.10. Kararlılık çalışması şişme indisi sonuçları (n=3)

Formülasyon kodu	Başlangıç ağırlığı (g) ± SH	Son ağırlık (g) ± SH	Şişme İndisi ± SH
	4°C	25°C	40°C
İK-1 0. Ay	0,338 ± 0,001	6,323 ± 0,353	17,767 ± 1,059
İK-1 1. Ay	0,335 ± 0,02	6,250 ± 0,378	17,657 ± 0,998
İK-1 3. Ay	0,337 ± 0,01	6,128 ± 0,344	17,184 ± 1,065

Çizelge 5.11. Kararlılık çalışması yüzey pH değeri sonuçları (n=3)

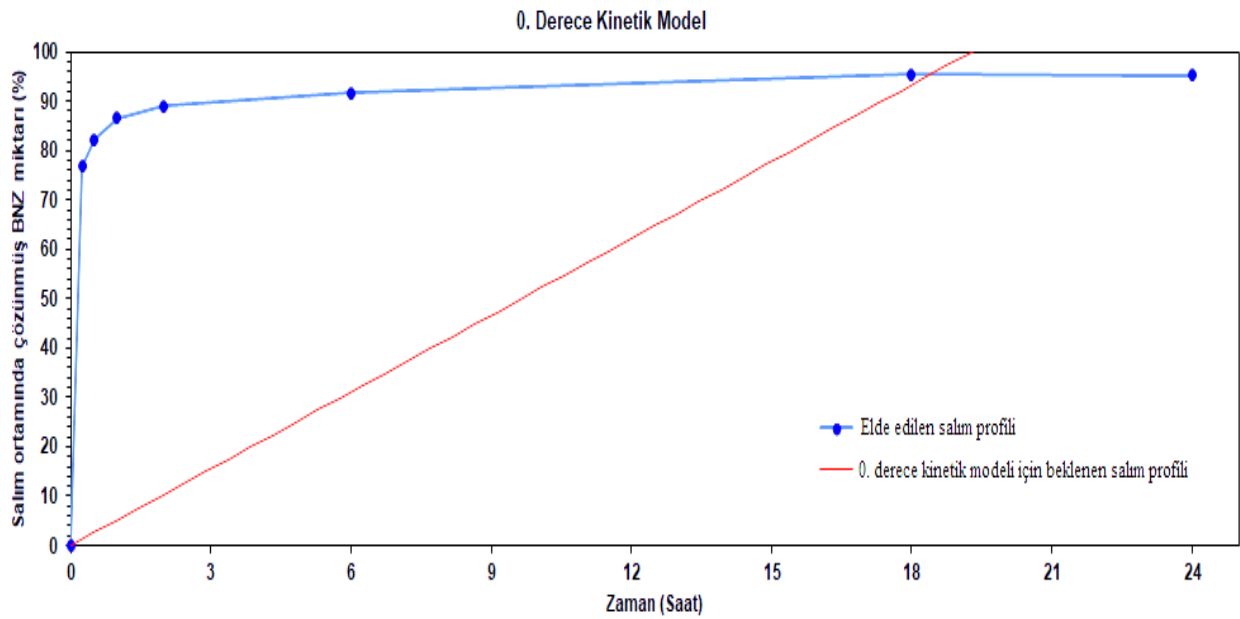
Formülasyon kodu	Yüzey pH değeri ± SH	Yüzey pH değeri ± SH	Yüzey pH değeri ± SH
	4°C	25°C	40°C
İK-1 0. Ay	6,60± 0,040	6,60 ± 0,040	6,60 ± 0,040
İK-1 1. Ay	6,54± 0,026	6,57 ± 0,035	5,25 ± 0,042
İK-1 3. Ay	6,52± 0,033	6,53 ± 0,044	4,56 ± 0,031

Farmakokinetik salım çalışması

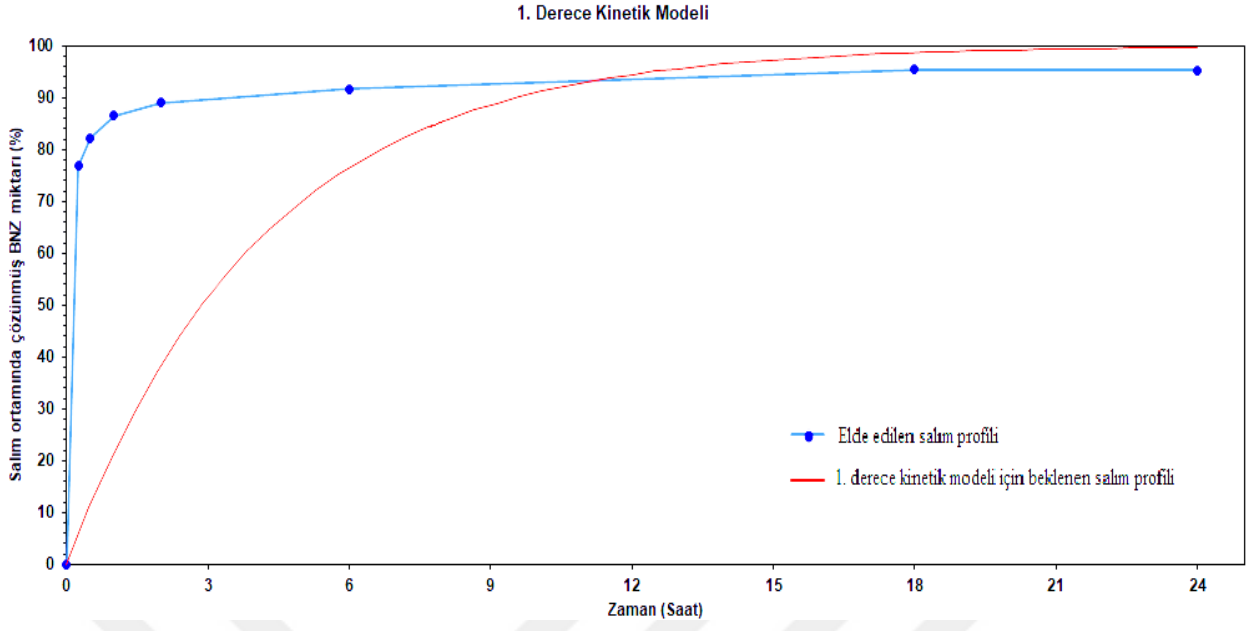
Hazırlanan KM formülasyonu için *in vitro* salım çalışması verileri farklı kinetik modellere uygulanmış ve formülasyonların hız sabiti (k), determinasyon katsayısı (r^2) ve Akaike bilgi kriterine (AIC) ait verileri Çizelge 5.12.'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.13., Şekil 5.14., Şekil 5.15., Şekil 5.16., Şekil 5.17., Şekil 5.18. ve Şekil 5.19.'da sunulmuştur.

Çizelge 5.12. Farmakokinetik model bulguları

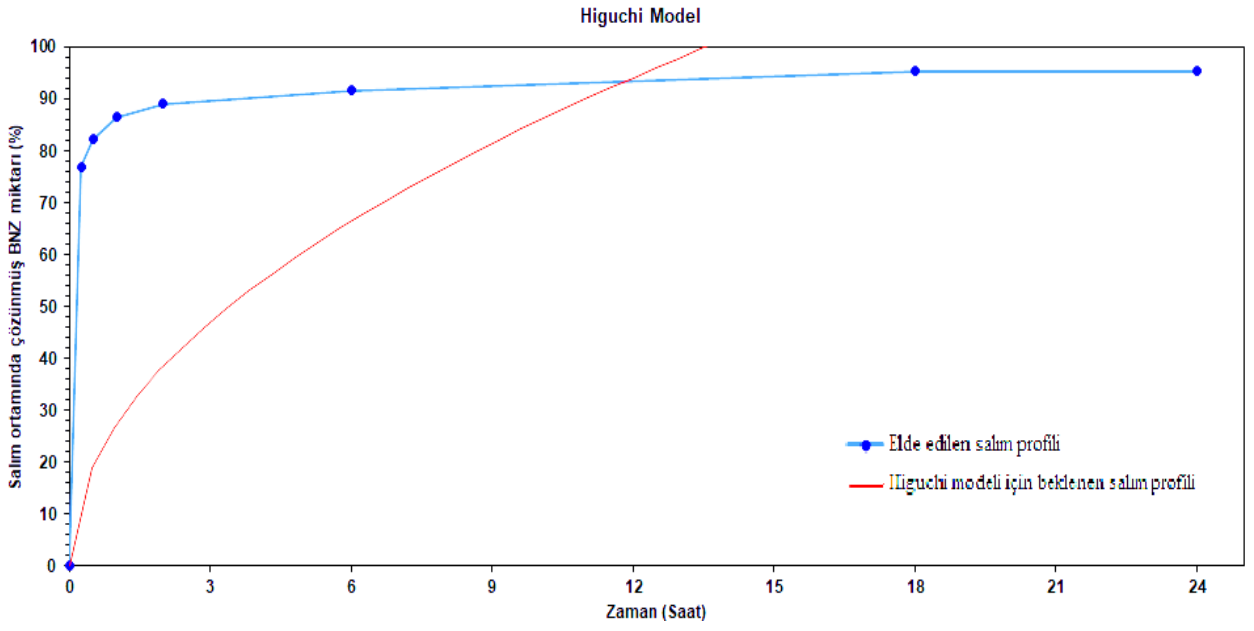
Model	Zero	First	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hixson-Crowell	Hopfenberg	Baker-Lansdale
R^2	-3,149	-1,419	-1,332	<u>0,997</u>	-1,901	-1,899	-1,537
R^2 adj	-3,149	-1,419	-1,332	<u>0,997</u>	-1,901	-2,382	-1,537
AIC	84,308	79,992	79,699	<u>27,486</u>	81,445	83,440	80,374
MSC	-3,506	-2,96	-2,930	<u>3,597</u>	-3,148	-3,397	-3,014
K0	5,185	-	-	-	-	-	-
K1	-	0,241	-	-	-	-	-
kHC	-	-	-	-	0,051	-	-
kHB	-	-	-	-	-	0,051	-
kBL	-	-	-	-	-	-	0,010
KH	-	-	27,160	-	-	-	-
kkp	-	-	-	84,450	-	-	-
n	-	-	-	0,044	-	3	-



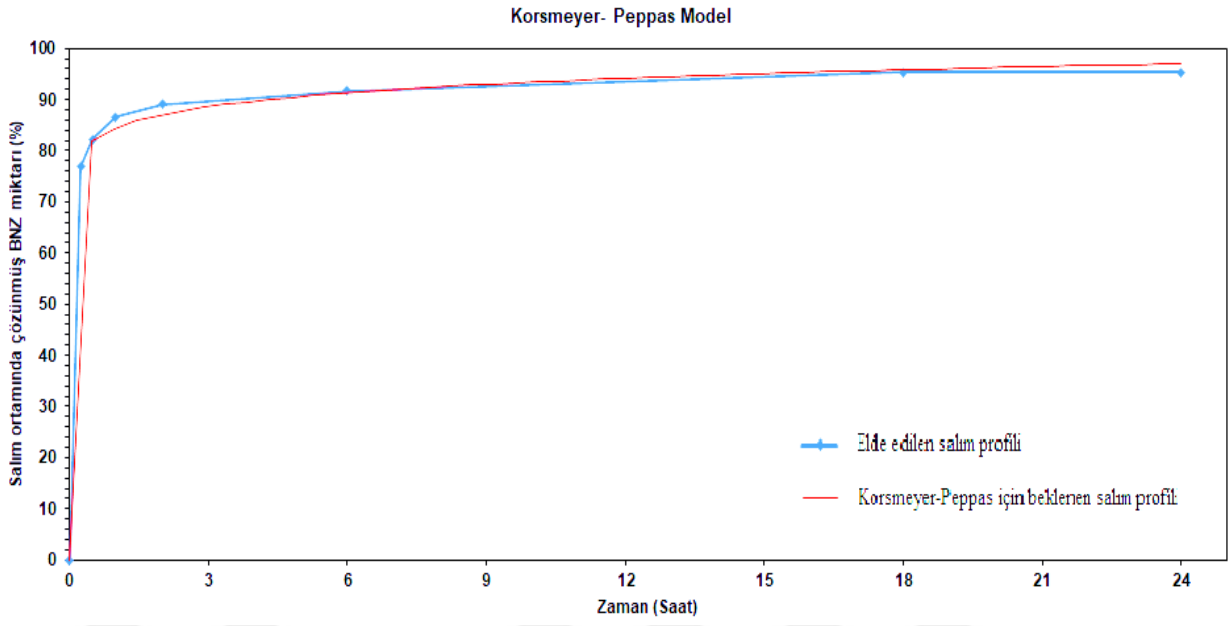
Şekil 5.13. İK-1 formülasyonu için sıfırıncı derece kinetik modeli



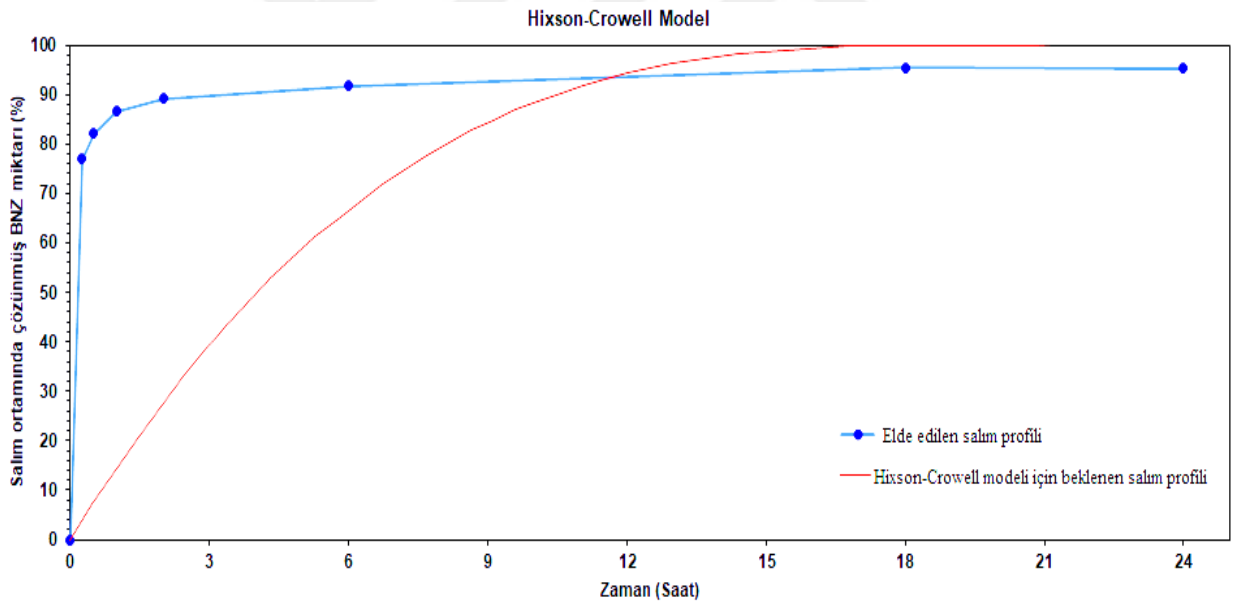
Şekil 5.14. İK-1 formülasyonu için birinci derece kinetik modeli



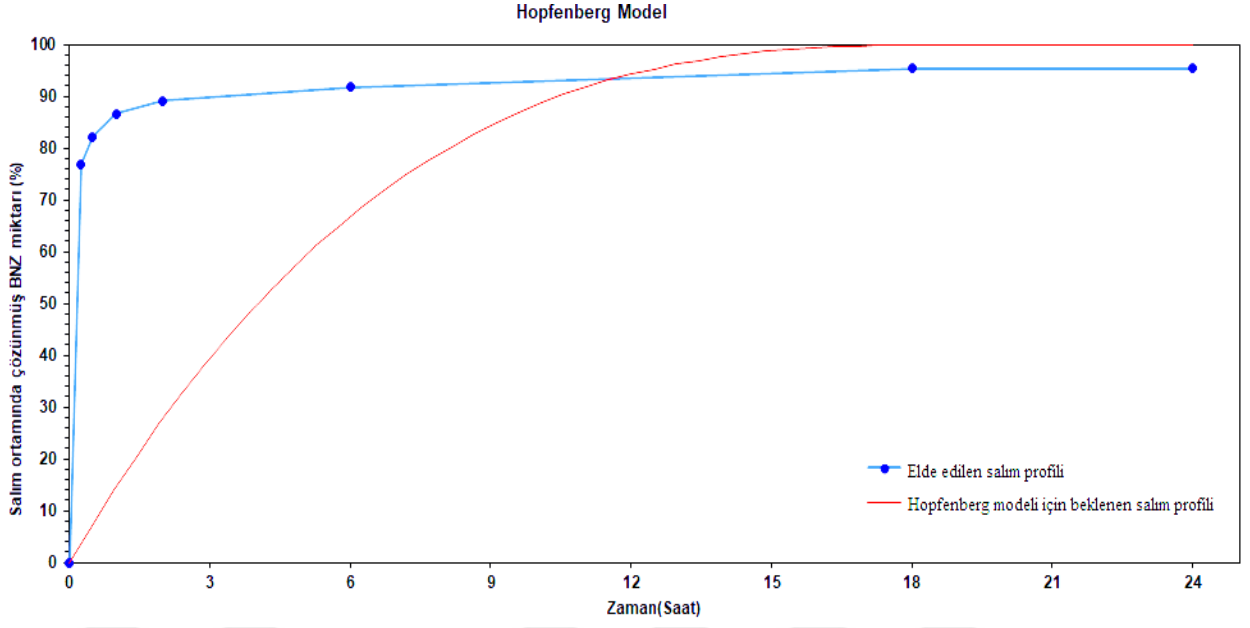
Şekil 5.15. İK-1 formülasyonu için Higuchi modeli



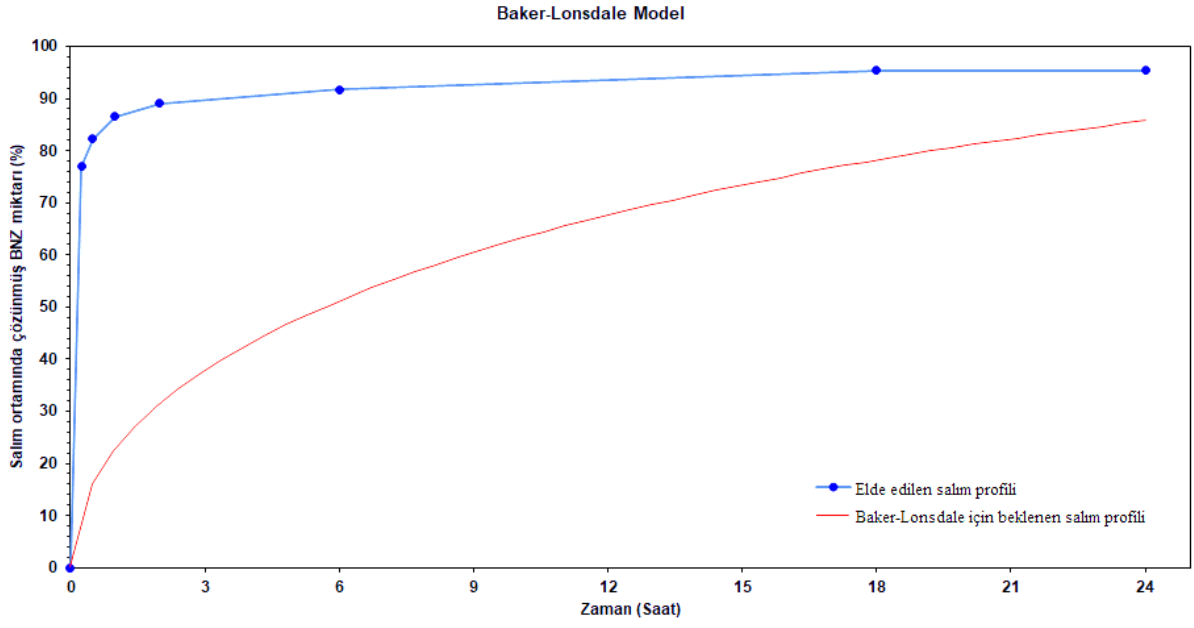
Şekil 5.16. İK-1 formülasyonu için Korsmeyer-Peppas modeli



Şekil 5.17. İK-1 formülasyonu için Hixson-Crowell modeli



Şekil 5.18. *İK-1 formülasyonu için Hopfenberg modeli*



Şekil 5.19. *İK-1 formülasyonu için Baker-Lonsdale modeli*

6. TARTIŞMA

Bu bölümde tez çalışmasında kullanılan etkin madde ve diğer maddelerin fizikokimyasal özelliklerine ait bulgular ile hazırlanan KM formülasyonuna ait *in vitro* çalışmaların bulguları tartışılacaktır.

6.1. Benzidamin HCl ve Yardımcı Maddeler ile Yapılan Çalışma

Formülasyon geliştirilmeden önce etkin madde ve yardımcı maddelerin fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Etkin maddenin DSC, XRD, FT-IR analizleri yapılmış ve belirlenen büyütme oranı ile taramalı elektron mikroskopunda görüntüsü alınmıştır. XRD ve FT-IR analizlerinin amacı formülasyonda kullanılan etkin maddenin saflığının kanıtlanması, formülasyondaki yardımcı maddelerin hazırlama koşullarında farklılaşmasının kontrol edilmesidir.

Formülasyon hazırlanması sırasında etkin maddenin davranışının değişen sıcaklık karşısında belirlenmesi için DSC yapılmıştır. Termogramda BNZ'nin erime derecesi (Şekil 5.1.) referans ile uyumlu olarak 162,8°C olarak belirlenmiştir (Sharma, Sharma ve Garg, 2018, s.287).

BNZ'nin X ışını kırınım analizinden elde edilen spektrumda karakteristik BNZ pikleri gözlenmiştir. 2θ açısı deresinde gerçekleştirilen analizde BNZ'ye özgü 7,18°, 16,84°, 20,71°, 21,46° ve 25,69° değerlerinde keskin ve dar pikler beklenmektedir. Çalışmada gerçekleştirilen X ışını kırınım analizi sonucunda elde edilen spektrum incelendiğinde değerlerin literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Sharma, Sharma ve Garg, 2018, s.287).

Etkin madde polimer, fiziksel karışım ve formülasyonun FT-IR spektrumları 4000-600 cm⁻¹ arasında kaydedilmiştir. BNZ için 1527 cm⁻¹, 1612 cm⁻¹'de görülen aromatik C=C ve C=N bağları ve 740-765 cm⁻¹ arasında görülen disüstitüe düzlem dışı deformasyon bandı, 707 cm⁻¹'de görülen monosüstitüe düzlem dışı deformasyon bandı ile 950-1200 cm⁻¹ arasında görülen C-C, C-N ve C-O eğilim bantları belirleyicidir. FT-IR analizi sonucu elde edilen spektrumun referans bilgisi ile karşılaştırıldığında çok az kayma ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Sharma, Sharma ve Garg, 2018, s.287, Shangai, Nangude ve Poddar, 2016, s.5).

Formülasyonda yardımcı madde olarak kullanılan KS için DSC ve XRD analizleri, PEG 6000 için DSC analizi yapılmıştır.

Polisakkaritler genellikle suya karşı güçlü bir afiniteye sahiptir ve katı halde düzensiz yapılara sahiptirler. KS'nin DSC analizinde 110-125°C arasında meydana gelen endotermik pik numunede bulunan bağlı suyun buharlaşması sebebiyle meydana geldiği düşünülmektedir. 30-300°C arasında yapılan analizde bu pik dışında endotermik pik ile karşılaşılmamıştır. Çalışmadan elde edilen termogram (Şekil 5.1.) incelendiğinde literatür ile uygunluk göstermiştir (Dudhani ve Kosaraju, 2010, s.247). Yapılan bir çalışmada kullanılan PEG 6000'in termogramı 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 20-200°C aralığında belirlenmiştir. PEG 6000 için 57 °C'de endotermik pik gözlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen termogram literatür ile uygunluk göstermiştir (Altamimi ve Neau, 2017, s.424).

KS'ye ait X-ışını kırınım profilinin belirlenmesi için literatürde 40 kV voltaj, 50 mA akım şiddeti, 2 θ açısı kullanılarak yapılan X ışını kırınım analizinde 2 θ = 10° ve 2 θ = 20° 'de pikler görülmüştür. XRD profilindeki pikler göz önüne alındığında KS'nin amorf yapıda olduğu belirlenmiştir. Çalışmada KS'ye ait X-ışını kırınım profili (Şekil 5.2.) literatür ile uyumlu bulunmuştur (Kumar ve Koh, 2012, s.6105)

6.2. KM formülasyonların hazırlanması ve karakterizasyonu

Saf halde bulunan BNZ'nin termogramında gözlenen endotermik pikin formülasyon termogramında görülmemesi, formülasyonlarda BNZ'nin kristal halden daha çok amorf halde olduğunu ve ilacın KM içine hapsedildiğini göstermektedir (Sanghai, Nangude ve Poddar, 2016, s.4).

Saf BNZ'nin XRD analizinde gösterdiği karakteristik pikler, İK-1 formülasyonunun XRD spektrumunda gözlenmemiştir. Bu durum ilacın polimerik matris sisteminde homojen bir şekilde dağıldığını göstermiştir (Sharma, Sharma ve Garg, 2018, s.287).

İlaç ve eksipyanlar arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi için uygulanan FT-IR analizi için, optimum formülasyon olan İK-1 formülasyonunun spektrumu kaydedilmiştir. İK-1 için kaydedilen spektrumda BNZ'ye ait pikler saf etkin maddeye göre daha zayıf halde izlenmiştir. Görülen karakteristik pikler yüklenmenin gerçekleştiğini ifade etmektedir (Ambikar vd., 2014, s.2) .

İK-1 formülasyonunun yapılan morfolojik incelemesinde hazırlanan formülasyonun üç boyutlu gözenekli yapıya sahip olduğu görülmüştür. İK-1'e ait SEM görüntüsü literatür ile benzerlik göstermiştir (Hu vd., 2018, s.158, Xie vd., 2018,s.1227, Su vd., 2017, s.426)

Hazırlanan KM yüzey pH'sı $6,60 \pm 0,04$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre İK-1 tükürük pH aralığında bir değer sağlamıştır ve ilaç uygulaması sırasında uygulama bölgesinde herhangi bir tahrişe sebep olmayacağı anlaşılmıştır (Kasseem, El-Meshad ve Fares, 2015, s.540).

Yara sargısının su emme ve tutma kabiliyeti, yarayı temizlemenin ve nemli tutmanın sağlanması için önemli bir özelliktir. KM'lerin mükemmel şişme özellikleri kanamayı durdurma ve nemli ortam sağlayarak iyileşmenin hızlanmasını sağlamak için önemlidir. Nemli yara yatağı yara iyileşmesinde ideal olarak kabul edilmektedir. Yapılan deney sonucu yüksek oranda şişme kapasitesine sahip olan İK-1'in nemli ortam sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırabileceği düşünülmüştür (Hu vd., 2018,s.157).

6.3. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon

İncelenen literatürlerde BNZ için *in vitro* salım ve miktar tayini çalışmalarında YBSK ve UV spektrofotometrik yöntemler kullanıldığı görülmüştür (Pechova vd.,2018, s.2512, Carlucci, Luliani ve Federico, 2010, s.855).

Yapılan tez çalışmasında YBSK yöntemi kullanılmıştır. Doğan ve Başçı'nın BNZ ile yaptığı çalışmada fosfat tamponu (pH 3.0): asetonitril (70:30) mobil faz olarak seçilmiş, madde pikinin görülmesi için yöntemde yer alan 230 nm dalga boyu seçilmiştir. Fakat çalışma sonucunda sağlıklı bir pik elde edilemediğinden yöntemden vazgeçilmiştir (Doğan ve Başçı, 2011, s.168).

Benson ve McElnay'ın yaptığı çalışmada mobil faz olarak 5mM sodyum dodesilsülfat içeren asetonitril: su: asetik asit (62:37,5:0,5 (h/h)) kullanılmıştır. Asetik asit ile sistem pH'sı 4'e ayarlanmıştır. Madde piki 232 nm'de beklenmiş ancak görülmemiştir. Madde piki elde edilemediğinden bu yöntem de kullanılamamıştır (Benson ve McElnay, 1987, s. 396).

Yapılan başka bir YBSK çalışmasında mobil faz olarak asetonitril:metanol:amonyum karbonat tamponu (pH 10.5) (37,5:37,5:25) kullanılmıştır. Literatürde madde piki için verilen 218 nm dalga boyunda sağlıklı ve tekrar elde edilebilir bir pik gözlenmediğinden bu yöntemden de vazgeçilmiştir (Carlucci, Luliani ve Federico, 2010, s.855).

Berko İlaç ile görüşülerek alınan metot bilgileri ışığında uygulanan yöntemde BNZ için ideal şiddet ve morfolojide pikin 212 nm dalga boyunda gözlemlendiği belirlenmiştir. Bu yöntemde mobil faz olarak sodyum dihidrojen fosfat dihidrat tamponu (pH 3.0): asetonitril (70:30) kullanılmıştır. Tampon çözeltisi hazırlandıktan sonra fosforik asit ile pH 3'e

ayarlanmıştır. Kaydedilen kromatogramlarda kuyruklu pik gözlenmiş, denenen yöntemler arasında en sağlıklı ve tekrar elde edilebilir olan yöntemin bu olduğu belirlenmiştir. Yönteme karar verildikten sonra analitik validasyon çalışması yapılmıştır. Doğrusallık çalışması sonucunda r^2 0,9995 olarak bulunmuş ve bu değere bağlı olarak analitik yöntemin doğrusallığı ispatlanmıştır. 3 farklı günde yapılan kesinlik çalışmalarında geliştirilen analitik yöntemin varyasyon katsayısı %2 değerinin altında bulunmuştur (Çizelge 5.2, Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4.) ve yöntemin kesinliği ispatlanmıştır. Yöntemin seçicilik çalışması için saf etkin madde ve boş formülasyon ile çalışmalar yapılmış ve kromatogramlarda herhangi bir girişim ya da pik oluşumu gözlenmemiştir. 3 farklı konsantrasyon ile çalışılan doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmalarında geliştirilen analitik yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır. Çalışmada etkin madde saptama sınırı hesaplanmış ve çalışmalar bu sınırlar içerisinde gerçekleştirilmiştir.

6.4. Kararlılık Çalışması

Optimum formülasyon olarak seçilen İK-1 kararlılık çalışmasının yapılması amacıyla kehribar renkli kaplarda 3 ay boyunca saklanmıştır. İK-1 formülasyonunun görünüş, etkin madde miktar tayini, yüzey pH'sının ölçümü ve şişme indisi tayini 3 ay boyunca incelenmiştir.

4°C, 25 °C ve 40 °C'de saklanan formülasyonların kararlılığının belirlenmesi için ilk olarak görünüşleri incelenmiştir. 3 ay sonunda 4°C ve 25 °C'de saklanan formülasyonun görünüşünde bir değişiklik gözlenmezken, 40 °C'de saklanan formülasyonun renginde sararma olduğu görülmüştür. 40 °C saklama koşullarının formülasyon için uygun olmadığı görülmüştür.

4°C, 25 °C ve 40 °C'de saklanan formülasyonların kararlılığının belirlenmesi için yapılan etkin madde miktar tayini 3 ay boyunca yapılan analizler ile kaydedilmiştir. Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak (two-way ANOVA) değerlendirilmiş ve anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0.05$).

4°C, 25 °C ve 40 °C'de saklanan formülasyonların kararlılığının belirlenmesi için yapılan şişme indisi tayini 3 ay boyunca yapılan analizler ile kaydedilmiştir. Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak (two-way ANOVA) değerlendirilmiş ve anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Belirlenen saklama koşullarında bekletilen formülasyonların yüzey pH değeri 0. zaman, 1. ay ve 3. ay ölçülmüştür. 4°C, 25 °C'de saklanan formülasyonların pH değeri uygun aralıklar içinde kalmıştır. Ancak 40 °C'de saklanan formülasyonun pH değeri değişiklik göstermiştir.

Formülasyon tükürük pH aralığı dışına çıktığından tahriş edici özellik gösterebileceğinden KM için en uygun saklama koşullarının 4°C ve 25 °C olduğu sonucuna varılmıştır.

6.5. İK-1 Formülasyonu *In Vitro* Salım Çalışması

Kontrollü ilaç salım sistemleri etkin maddenin hedeflenen bölgeye kontrollü ve sürekli bir şekilde salımını gerçekleştirmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu sistemler hastalarda aynı terapötik etkiyi sağlamak amacıyla gereken etkin madde miktarının azaltılmasını sağlar. Daha az uygulama ve daha etkili dozlar ile hasta uyuncunda artış görülür (Huang ve Brazel, 2001, s.121).

BNZ'nin ticari olarak kullanılan preparatlarında tükürük sıvısı sebebiyle pH'sının hızla 7'ye yükselmesi sonucu bukkal emilimi sınırlıdır ve bu durum gargara şeklindeki piyasa preparatının günde en az üç kere kullanımını gerektirmektedir. Yapılan çalışmada KM hazırlanma amacı etkin maddenin salımının kontrollü ve sürekli hale getirilmesidir. Yapılan *in vitro* salım çalışmasında BNZ'nin KM'den salımının 20 saatin üzerinde olduğu görülmüştür.

Simüle tükürük sıvısında yapılan *in vitro* salım çalışmasında, İK-1 formülasyonundan kümülatif etkin madde salımı 24 saat sonunda $95,33 \pm 3,50$ olarak bulunmuştur. Saf etkin madde ile karşılaştırmalı olarak yapılan salım çalışmasında BNZ salımının kontrollü hale getirildiği gözlenmiştir. Başlangıçta çözünme ortamının hızlı difüzyonu ve ilacın hızlı çözünürlüğü sebebiyle patlama etkisinin gözlemlendiği, daha sonra ilaç serbest bırakmayı geciktiren her bir partikülün etrafında sınırlayıcı bir zar olmasından kaynaklandığı öngörülen uzatılmış bir salım meydana gelmiştir (Nagarajan vd., 2015, s.26). Patlama etkisinden sonra ilaç salımı difüzyon mekanizması ile gerçekleşmiştir (Kasseem, El-Meshad ve Fares, 2015, s.543).

In vitro salım çalışmaları formülasyonların geliştirilmesinde ve kalite kontrolünde oldukça önemli bir rol oynar. Salım çalışmaları ilaçların kararlılığının belirlenmesinin yanı sıra *in vivo* absorpsiyonun tahmini için de kullanılır. Bu yöntem *in vivo* çalışma yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha hızlı ve daha ucuz bir tekniktir (Zhang vd.,2010, s.263).

Salım analizi, salım profillerini istatistiksel olarak karşılaştırarak veya farmasötik bir dozaj formundan ilaç salımını ölçmek ve karakterize etmek için matematiksel modeller kullanılarak gerçekleştirilir. Hesaplama süresini kısaltmak ve hesaplama hatalarını ortadan kaldırmak amacıyla, araştırmacılar kırk dahili salım modelini kullanarak salım verilerinin modellenmesini sağlayan DDSolver programını tasarlamışlardır (Zuo, Bou-Chacra ve Löbenberg, 2014, s.2).

In vitro salım deneyi sonucunda hazırlanan KM formülasyonunun zamana karşı % kümülatif salınan miktar hesaplandığında 24 saat boyunca salım yaptığı görülmüştür. Salım sonuçları salım kinetiği modelinin belirlenmesi için DDSolver programına aktarılmıştır. Modelin belirlenmesi için kullanılan kriterler hız sabiti (k), Akaike bilgi kriteri (AIC), determinasyon katsayısı(r^2) ve model seçim kriteri (MSC)'dir. Değerlendirmede sıfır derece kinetik, birinci derece kinetik, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Hopfenberg ve Baker-Lansdale modellerini değerlendirmek için en yüksek R^2 , R^2_{adj} ve MSC değeri ve en düşük AIC değeri kullanılmıştır (Zhang vd.,2010, s.263). Yapılan değerlendirme sonucunda salım profilinin Korsmeyer-Peppas modeline uyum gösterdiği belirlenmiştir.

Korsmeyer-Peppas modeli ilaç etkin maddesinin geliştirilen taşıyıcıdan kontrollü olarak salındığını gösterir (Dash vd., 2010, s.220). KM'lerden gerçekleşen ilaç salımının bağlı olduğu sünger yüzeyinden ilaç salımı, şişmiş matris boyunca difüzyon ve polimer erozyonu gibi üç farklı mekanizma sayesinde kontrollü salım gerçekleşmiş olabileceği kanısına varılmıştır (Kasseem, El-Meshad ve Fares, 2015, s.546).

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kitosan ile hazırlanan BNZ yüklü mikrosünger ideal formülasyonunun termal, X- ışını kırınımı, FT-IR analiz sonuçları ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri literatür ile paralellik göstermiştir. Ayrıca formülasyonun ilaç salım özellikleri aydınlatılmıştır.

BNZ'nin miktar tayini için çalışmada kullanılan yöntemin doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik parametreleri incelenmiş ve yöntemin yapılacak çalışmalar için uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Hazırlanan mikrosünger formülasyonun *in vitro* salım çalışması verileri kullanılarak kinetik modeli belirlenmiştir. Belirlenen model ile hazırlanan formülasyonun salımının kitosan mikrosünger ile kontrollü hale getirildiği belirlenmiştir. Geliştirilen kararlı ve güvenli formülasyonun dış çekimi bölgesinde BNZ'nin sürekli ve kontrollü olarak salımı için umut verici bir taşıyıcı sistem olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar ışığında yapılması planlanan *in vivo* tayinlerde hazırlanmış olan formülasyonların etkinliğinin değerlendirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Acar, Y. A., Kalkan, M., Çetin, R., Çevik, E. and Çınar, O. (2014). Acute psychotic symptoms due to benzydamine hydrochloride abuse with alcohol. *Case reports in psychiatry*, 2014.
- Ahmed, S. and Ikram, S. (2016). Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achievements in the life sciences*, 10(1), 27-37.
- Ahsana, S. M., Thomas, M., Reddy, K. K., Sooraparaju, S. G., Asthana, A. and Bhatnagar, I. (2018). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, (110), 97-109.
- Ali, A. and Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, 109, 273-286.
- Altamimi, M. A. and Neau, S. H. (2017). Investigation of the in vitro performance difference of drug-Soluplus® and drug-PEG 6000 dispersions when prepared using spray drying or lyophilization. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(3), 419-439.
- Altan, S. (2010). *Ağız ve Diş Preparatlarında Farmasötik ve Mikrobiyolojik Kalite Kontrol Çalışmaları*. Yüksek Lisans Tezi, Mersin, Mersin Üniversitesi.
- Ambikar, R. B., Powar P. V. , Deokar G. S. and Sharma P. H. (2014). Design and *In Vitro* Evaluation of Benzydamine Hydrochloride Effervescent Tablets for Vaginal Delivery. *Journal Of Modern Drug Discovery And Drug Delivery Research*, 1-5.
- Bai, R., Yang, F., Zhang, Y., Zhao, Z., Liao, Q., Chen, P., Chen, P., Zhao, P., Guo, W. and Cai, C., (2018). Preparation of elastic diglycolamic-acid modified chitosan sponges and their application to recycling of rare-earth from waste phosphor powder. *Carbohydrate polymers*, 190, 255-261.
- Baldrick, P. (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 56(3), 290-299.
- Bano, I., Arshad, M., Yasin, T., Ghauri, M. A. and Younus, M. (2017). Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *International journal of biological macromolecules*, 102, 380-383.
- Bansal, V., Sharma, P. K., Sharma, N., Pal, O. P. and Malviya, R. (2011). Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. *Advances in Biological Research*, 5(1), 28-37.
- Bassuoni, Y. F., Elzanfaly, E. S., Essam, H. A. M. and Zaazaa and H. E. (2017). Ion Selective Electrode Approach for In-line Determination of Benzydamine Hydrochloride in Different Matrices of Pharmaceutical Industry. *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry*, 9(1), 65-79.
- Benson, H. A. and McElnay, J. C. (1987). High-performance liquid chromatography assay for the measurement of benzydamine hydrochloride in topical pharmaceutical preparations. *Journal of Chromatography A*, 394(2), 394-399.
- Berretta, J., Bumgardner, J. D. And Jennings, J. A. (2017). Lyophilized chitosan sponges. In *Chitosan Based Biomaterials Volume 1*, 239-253.
- Canpolat, H., (2006). Postoperatif Boğaz Ağrısına Benzidamin Hidroklorür ve Dekspantenolün Etkisi, Uzmanlık Tezi, Malatya, İnönü Üniversitesi.

- Carlucci, G., Juliani, P. and Di Federico, L. (2010). Simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and five impurities in an oral collutory as a pharmaceutical formulation by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatographic science*, 48(10), 854-859.
- Ciğerim, L. *Alt Gömülü Yirmi Yaş Dişi Cerrahisinde Naproksen Sodyum + Kodein Fosfat, Diklofenak Potasyum ve Benzidamin Hidroklorür'ün Postoperatif Ağrı, Ödem ve Trismus Üzerine Etkilerinin Kıyaslanması*. Doktora Tezi, Van, Yüzüncü Yıl Üniversitesi.
- Croisier, F. and Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- Çolak, Ş. (2016). Investigation of radiosterilization of Benzydamine Hydrochloride by electron spin resonance spectroscopy. *Radiation Physics and Chemistry*, 127, 204-209.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L. and Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217-23.
- Denkbaş, E. U. R. B., Öztürk, E., Özdemir, N., Keçeci K. and Agalar, C. (2004). Norfloxacin-loaded chitosan sponges as wound dressing material. *Journal of biomaterials applications*, 18(4), 291-303.
- Dogan, A. and E Bascı, N. (2011). Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative determination of chlorhexidine gluconate and benzydamine hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. *Current Pharmaceutical Analysis*, 7(3), 167-175.
- Dudhani, A.R. and Kosaraju, S.L.(2010). Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydrate polymers*, 81(2), 243-251.
- El-laithy, H. M., El-Feky, G. S., Elkady, O. A., Zikry, P. M., Yassin, K. M., Amin, E. A. and Saeed, H. (2015). Multi-Drug Loaded Chitosan/Gelatin Composite Sponge for Dental Application, *International Journal of Emerging Trends in Electrical and Electronics*, 11(02), 161-165.
- Griffon, D. J., Sedighi, M. R., Schaeffer, D. V., Eurell, J. A. and Johnson, A. L. (2006). Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta biomaterialia*, 2(3), 313-320.
- Hamedi, H., Moradi, S., Hudson, S. M. and Tonelli, A. E. (2018). Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate polymers*, 445-460.
- Hu, S., Bi, S., Yan, D., Zhou, Z., Sun, G., Cheng, X. and Chen, X. (2018). Preparation of composite hydroxybutyl chitosan sponge and its role in promoting wound healing. *Carbohydrate polymers*, 184, 154-163.
- Hnátová, M., Bakoš, D. and Michliková, M. (2016). Chitosan sponge matrices with β -cyclodextrin for berberine loading. *Chemical Papers*, 70(9), 1262-1267.
- ICH Steering Committee, 1996. ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: methodology, *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, International Commission on Harmonisation, London*.

- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P. S., Nair, S. V. and Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology advances*, 29(3), 322-337.
- Karavana, S. Y., Sezer, B., Güneri, P., Veral, A., Boyacıoğlu, H., Ertan, G. and Epstein, J. B. (2011). Efficacy of topical benzydamine hydrochloride gel on oral mucosal ulcers: an in vivo animal study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 40(9), 973-978.
- Karavana, S.Y.(2007). *Bioadhesiv Benzidamin Hidroklorür Formülasyonlarının Hazırlanması ve In Vitro-In Vivo Değerlendirilmesi*. Doktora Tezi. İzmir, Ege Üniversitesi.
- Kassem, M. A., El Meshad, A. N. and Fares, A. R. (2015). Lyophilized sustained release mucoadhesive chitosan sponges for buccal bupirone hydrochloride delivery: formulation and in vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 16(3), 537-547.
- Kmiec, M., Pighinelli, L., Tedesco, M. F., Silva, M. M. and Reis, V. (2017). Chitosan-properties and applications in dentistry. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access*, 2(4), 00035.
- Ko, Y. G., Kawazoe, N., Tateishi, T. and Chen, G. (2010). Preparation of chitosan scaffolds with a hierarchical porous structure. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 93(2), 341-350.
- Kose-Ozkan, C., Savaser, A., Tas, C. and Ozkan, Y. (2010). The development and in vitro evaluation of sustained release tablet formulations of benzydamine hydrochloride and its determination. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 13(8), 683-689.
- Kumar, S. and Koh, J. (2012). Physicochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *International journal of molecular sciences*, 13(5), 6102-6116.
- Li, D., Diao, J., Zhang, J. and Liu, J. (2011). Fabrication of new chitosan-based composite sponge containing silver nanoparticles and its antibacterial properties for wound dressing. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 11(6), 4733-4738.
- Ma, J., Wang, H., He, B. and Chen, J. (2001). A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials*, 22(4), 331-336.
- Matsvaire, T. (2017). *Synthesis and characterisation of chitosan based sponges for wound dressings*. Yüksek Lisans Tezi, Stellenbosch, Stellenbosch Üniversitesi.
- Muanprasat, C. and Chatsudhipong, V. (2017). Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacology & therapeutics*, 170, 80-97.
- Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P. and De La Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International journal of biological macromolecules*, 105 (2), 1358-1368.
- Nagarajan, P., Sathesh Kumar, K., Peter Christopher, G.V., Arthi, K. and Aruljothy, M. (2015). Formulation physical characterization and in-vitro release studies of novel polymer composites for chronic wound healing. *Der Pharmacia Sinica*, 2015, 6(2), 19-29.
- Oryan, A. and Sahvieh, S. (2017). Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1003-1011.

- Özkan, B.R. (2008). *Preoperatif Olarak Uygulanan İntravenöz Parasetamol Ve İbuprofen Oral Süspansiyonun Gömülü Mandibular Üçüncü Molar Cerrahisi Sonrası Analjezik Etkinliği ve Güvenliği Açısından Karşılaştırılması*, Doktora Tezi, Konya, Selçuk Üniversitesi.
- Park, Y. J., Lee, Y. M., Park, S. N., Sheen, S. Y., Chung, C. P. and Lee, S. J. (2000). Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials*, 21(2), 153-159.
- Parker, A. C., Beenken, K. E., Jennings, J. A., Hittle, L., Shirliff, M. E., Bumgardner, J. D., Smeltzer, M.S. and Haggard, W. O. (2015). Characterization of local delivery with amphotericin B and vancomycin from modified chitosan sponges and functional biofilm prevention evaluation. *Journal of Orthopaedic Research*, 33(3), 439-447.
- Parker, A. C., Rhodes, C., Jennings, J. A., Hittle, L., Shirliff, M., Bumgardner, J. D. and Haggard, W. O. (2016). Preliminary evaluation of local drug delivery of amphotericin B and in vivo degradation of chitosan and polyethylene glycol blended sponges. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(1), 78-87.
- Pellá, M. C., Lima-Tenório, M. K., Tenório-Neto, E. T., Guilherme, M. R., Muniz, E. C., and Rubira, A. F. (2018). Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 196, 233-245.
- Perinelli, D. R., Fagioli, L., Campana, R., Lam, J. K., Baffone, W., Palmieri, G. F., Casettari, L. and Bonacucina, G. (2018). Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 117, 8-20.
- Perioli, L., Ambrogi, V., Venezia, L., Giovagnoli, S., Pagano, C. and Rossi, C. (2009). Formulation studies of benzydamine mucoadhesive formulations for vaginal administration. *Drug development and industrial pharmacy*, 35(7), 769-779.
- Pillai, C. K. S., Paul, W. and Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science*, 34(7), 641-678.
- Quane, P.A., Graham, G.G. and Ziegler, J.B. (1998). Pharmacology of benzydamine. *Inflammopharmacology*, 6(2), 95-107.
- Revi, D., Paul, W., Anilkumar, T. V. and Sharma, C. P. (2014). Chitosan scaffold co-cultured with keratinocyte and fibroblast heals full thickness skin wounds in rabbit. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(9), 3273-3281.
- Sah, A. K., Dewangan, M. and Suresh, P. K. (2019). Potential of chitosan-based carrier for periodontal drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185-198.
- Sanghai, P., Nandgude, T. and Poddar, S. (2016). Formulation of bilayer benzydamine HCl patch targeted for gingivitis. *Journal of drug delivery*, 2016.
- Settimi, L., Davanzo, F., Lauria, L., Casini, M. L. and Ferrazin, F. (2012). Oral ingestion of a topical benzydamine hydrochloride-containing gynaecological preparation in association with television advertising in Italy: analysis of cases managed by a National Poison Control Centre. *BMJ open*, 2(1), e000204.
- Sharma, D., Sharma, A. and Garg, R. (2018). Design, Development and In vitro/Ex vivo Evaluation of Mucoadhesive Buccal Film of Benzydamine Hydrochloride for the Effective Treatment of Aphthous Stomatitis. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 12(4), 277-294.

- Shukla, S.K., Mishra, A.K., Arotiba, O.A. and Mamba, B.B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International journal of biological macromolecules*, 59, 46-58.
- Su, C., Yang, H., Zhao, H., Liu, Y. and Chen, R. (2017). Recyclable and biodegradable superhydrophobic and superoleophilic chitosan sponge for the effective removal of oily pollutants from water. *Chemical Engineering Journal*, 330, 423-432.
- Pechová, V., Gajdziok, J., Muselík, J. and Vetchý, D. (2018). Development of Orodispersible Films Containing Benzydamine Hydrochloride Using a Modified Solvent Casting Method. *AAPS PharmSciTech*, 19(6), 2509-2518.
- Tırnaksız, F. (2004). Kozmetik Bilimi, Y. Yazan (Ed.), *Ağız ve Diş Sağlığı Bakım Ürünleri* içinde s.197-212. Eskişehir, Nobel Tıp Kitapevleri.
- Türp, J. C. and Alt, K. W. (1998). Anatomy and morphology of human teeth. In: *Dental Anthropology* (pp. 71-94). Springer, Vienna.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J. and Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170-179.
- Xie, Y., Yi, Z. X., Wang, J. X., Hou, T. G. and Jiang, Q. (2018). Carboxymethyl konjac glucomannan-crosslinked chitosan sponges for wound dressing. *International journal of biological macromolecules*, 112, 1225-1233.
- Xing, J., Wang, X., Xun, J., Peng, J., Xu, Q., Zhang, W. and Lou, T. (2018). Preparation of micro-nanofibrous chitosan sponges with ternary solvents for dye adsorption. *Carbohydrate Polymers*, 198, 69-75.
- Zhang, J., Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahı, T., Gu, W. and Li, B. (2010). Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Marine drugs*, 8(7), 1962-1987.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C. and Xie, S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS journal*, 12(3), 263-271.
- Zuo, J., Gao, Y., Bou-Chacra, N. and Löbenberg, R. (2014). Evaluation of the DDSolver software applications. *BioMed research international*.

¹<https://www.ilactr.com/ilac/heksoben-gargara.html>

Erişim tarihi (2.04.2019)

²<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65464>

Erişim tarihi (7.04.2019)

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Nur İlge ÇİNAR

Yabancı Dil : İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı : VAN/1994

E-Posta : nurilgecinar@anadolu.edu.tr, nurilgecinar@gmail.com

Eğitim Geçmişi:

- İlköğretim : 2000-2008, Cumhuriyet Özel İdare İlköğretim Okulu
- Lise : 2008-2012, Polatlı Anadolu Lisesi
- Lisans : 2012-2017 , Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Mesleki Geçmiş:

- 01.08.2017, İkinci Eczacı, Polatlı Güneş Eczanesi