



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DENTAL CERRAHİ İŞLEMLER SONRASINDA KEMİK
REJENERASYONUNDA KULLANILMAK ÜZERE BÜYÜME
FAKTÖRÜ VE ANTİBİYOTİK YÜKLÜ NANOPARTİKÜL,
FİLM VE GREFT MATERYALİ KOMBİNASYONLARININ
HAZIRLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Miray İLHAN

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN**

**ANKARA
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENTAL CERRAHİ İŞLEMLER SONRASINDA KEMİK
REJENERASYONUNDA KULLANILMAK ÜZERE BÜYÜME
FAKTÖRÜ VE ANTİBİYOTİK YÜKLÜ NANOPARTİKÜL,
FİLM VE GREFT MATERYALİ KOMBİNASYONLARININ
HAZIRLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Miray İLHAN

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN**

**ANKARA
2019**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Dental cerrahi işlemler sonrasında kemik rejenerasyonunda kullanılmak üzere büyüme faktörü ve antibiyotik yüklü nanopartikül, film ve greft materyali kombinasyonlarının hazırlanması ve değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir ve hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma ve araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Miray İLHAN

Tarih: 02.09.2019

İmza:




KABUL VE ONAY

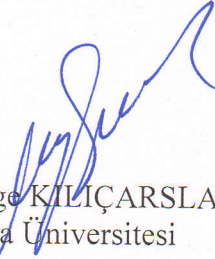
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

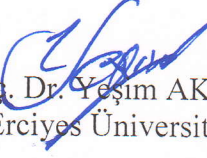
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında Miray İLHAN tarafından hazırlanan “Dental cerrahi işlemler sonrasında kemik rejenerasyonunda kullanılmak üzere büyüme faktörü ve antibiyotik yüklü nanopartikül, film ve greft materyali kombinasyonlarının hazırlanması ve değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02.09.2019


Prof. Dr. Asuman BOZKIR
Ankara Üniversitesi


Prof. Dr. Ayhan SAVAŞER
Sağlık Bilimleri Üniversitesi


Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN
Ankara Üniversitesi


Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ
Erciyes Üniversitesi


Doç. Dr. Nilsun BAĞIŞ
Ankara Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kemik Dokusu ve Kemik Dejenerasyonu	2
1.2. Diş, Dişi Destekleyen Çevre Dokular ve Yaygın Hastalıkları	3
1.3. Periodontal Rejeneratif Tedavi Yaklaşımları	5
1.3.1. Rejenerasyon Tedavisinde Kemik Greftleri	6
1.3.1.1. İmplant Edilebilen Sentetik Kemik Greftleri ve Doku İskeleleri	7
1.3.2. Rejenerasyon Tedavisinde Büyüme Faktörleri ve Antibiyotikler	8
1.3.2.1. Büyüme Faktörleri	8
1.3.2.2. Antibiyotikler	10
1.3.2.3. Büyüme Faktörü ve/veya Antibiyotik İçeren Rejeneratif Kontrollü Salım Sistemleri ve Üretim Yöntemleri	12
1.3.2.3.1. Filmler	20
1.3.2.3.2. Partiküler Sistemler	24
1.3.2.3.3. Kombine Sistemler	27
1.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Polimerlerle İlgili Genel Bilgiler	30
1.4.1. Kitozan	31
1.4.2. Aljinat	32
1.4.3. Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA)	33
1.5. Bilgisayarlı Tomografiyle Üç Boyutlu Analiz	35
1.6. Çalışmada Kullanılan Etken Maddelerle İlgili Genel Bilgiler	39
1.6.1. Kemik Morfogenetik Protein	39
1.6.2. Klindamisin Fosfat	43
2. GEREÇ VE YÖNTEM	46
2.1. Gereçler	46
2.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Maddeler	46
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	47
2.2. Yöntemler	49
2.2.1. Klindamisin Fosfat Üzerinde Yapılan Kontroller	49
2.2.1.1. Klindamisin Fosfatın Ayrımsal Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	49
2.2.1.2. Klindamisin Fosfat Miktar Tayini Yönteminin Belirlenmesi	49
2.2.1.3. Çözünme Ortamının Hazırlanması	49
2.2.1.4. Klindamisin Fosfatın HPLC ile Miktar Tayini	50

2.2.1.5. Klindamisin Fosfatın <i>In vitro</i> Çözünme Ortamında ve % 0,3 PVA Çözeltilisinde Kalibrasyonu	51
2.2.2. BMP Üzerinde Yapılan Kontroller	51
2.2.2.1. BMP'nin ELISA Kit ile Kalibrasyonu	52
2.2.2.2. BSA'nın BCA Kit ile Kalibrasyonu	54
2.2.3. Kullanılan Analitik Yöntemlerin Validasyonu	55
2.2.3.1. Doğruluk	55
2.2.3.2. Kesinlik	56
2.2.3.3. Seçicilik	57
2.2.3.4. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	57
2.2.3.5. Doğrusallık	58
2.2.4. Film Formülasyonlarının Hazırlanması ve Özelliklerinin İncelenmesi	59
2.2.4.1. Kitozan Film Formülasyonlarının Hazırlanması	59
2.2.4.2. Aljinat Film Formülasyonlarının Hazırlanması	61
2.2.4.3. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarının Hazırlanması	62
2.2.4.3.1. Kompleks Film Formülasyonlarında Etken Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin İncelenmesi	65
2.2.4.3.1.1. Ayrımsal Taramalı Kalorimetri Analizi	65
2.2.4.3.1.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) Analizleri	66
2.2.4.4. Film Formülasyonlarının Döküm Öncesi Viskozluk Tayini	66
2.2.4.5. Filmlerde Kalınlık ve Ağırlık Tayini	66
2.2.4.6. Filmlerde İşlem Etkinliği Tayini	67
2.2.4.7. Filmlerde <i>In vitro</i> Çözünme Hızı Tayini	67
2.2.4.8. Film Formülasyonlarının <i>In vitro</i> Şişme Özelliklerinin İncelenmesi	68
2.2.4.9. Film Formülasyonlarının <i>In vitro</i> Adeziv Özelliklerinin İncelenmesi	68
2.2.4.10. Film Formülasyonlarının Görüntülenmesi	70
2.2.4.10.1. Optik Mikroskop	70
2.2.4.10.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi	70
2.2.4.10.3. Mikro-BT	70
2.2.5. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Özelliklerinin İncelenmesi	72
2.2.5.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması	73
2.2.5.2. Nanopartiküllerde Etken Madde - Yardımcı Madde Etkileşiminin İncelenmesi	77
2.2.5.2.1. Ayrımsal Taramalı Kalorimetri Analizi	77
2.2.5.3. Nanopartiküllerde Partikül büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Tayini	78
2.2.5.4. Nanopartiküllerin % Verim ve % İşlem Etkinliğinin Tayini	78
2.2.5.5. Nanopartiküllerde <i>In vitro</i> Çözünme Hızı Tayini	79
2.2.5.6. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi	79
2.2.5.6.1. SEM Analizi	79
2.2.5.6.2. Mikro-BT Analizi	80
2.2.6. Nanopartikül-Film ve Nanopartikül-Greft Kombinasyonlarının Hazırlanması ve Özelliklerinin İncelenmesi	81
2.2.6.1. Kombinasyon Formülasyonlarında <i>In vitro</i> Çözünme Hızı Tayini	82
2.2.7. Formülasyonlara Sterilizasyon İşleminin Uygulanması	83
2.2.8. Seçilen Formülasyonlar için <i>In vivo</i> Deneilerin Gerçekleştirilmesi	83

2.2.8.1. Deney Hayvanlarının Seçimi, Ön Hazırlığı ve Formülasyonların Uygulanması	83
2.2.8.2. Hayvanların Sakrifikasyonu ve Analiz Edilecek Dokuların Çıkarılması	85
2.2.8.3. Dokuların Mikro-BT Analizleri	86
2.2.8.4. Dokuların Patomorfolojik Analizlerinin Gerçekleştirilmesi	86
2.2.8.4.1. Makroskobik İncelemeler	87
2.2.8.4.2. Mandibular Dokudan Kesit Alınması	87
2.2.8.4.3. Histopatolojik İncelemeler	87
2.2.9. İstatistiksel Analiz	88
3. BULGULAR	89
3.1. Klindamisin Fosfat ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	89
3.1.1. Klindamisin Fosfatın DSC Termogramı	89
3.1.2. Klindamisin Fosfatın Çözünme Ortamındaki HPLC Kromatogramı	90
3.1.3. Klindamisin Fosfatın <i>In vitro</i> Çözünme Ortamında ve % 0,3 PVA Çözeltilisinde Elde Edilen Kalibrasyon Doğruları	90
3.1.4. Klindamisin Fosfat'ın HPLC Yöntemi ile Miktar Tayininin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular	93
3.1.4.1. Doğruluk	93
3.1.4.2. Kesinlik	94
3.1.4.3. Seçicilik	95
3.1.4.4. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	96
3.1.4.5. Doğrusallık	96
3.2. Kemik Morfogenetik Proteinin Miktar Tayinine Ait Bulgular	97
3.2.1. BMP'nin ELISA Kit ile Kalibrasyonuna Ait Bulgular	97
3.2.2. BMP'nin ELISA Kit ile Validasyonuna Ait Bulgular	98
3.2.3. BSA'nın BCA Kit ile Kalibrasyonuna Ait Bulgular	98
3.3. Film Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular	99
3.3.1. Filmlerin Döküm Öncesi Viskozluğu, Film Kalınlık ve Ağırlığına Ait Bulgular	99
3.3.2. Filmlerin İşlem Etkinliği ve Şişme Özelliklerine Ait Bulgular	101
3.3.3. Kompleks Film Formülasyonlarında DSC ve FTIR Analizlerine Ait Bulgular	104
3.3.4. Filmlerin <i>In vitro</i> Çözünme Hızı Deneyine Ait Bulgular	106
3.3.4.1. Kompleks Film Formülasyonlarının <i>In vitro</i> Salım Kinetiklerine Ait Bulgular	114
3.3.5. Kompleks Filmlerin <i>In vitro</i> Adezif Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular	115
3.3.6. Kompleks Film Formülasyonlarının Görüntülenmesine Ait Bulgular	117
3.3.6.1. Filmlerin Optik Mikroskopla Görüntülenmesine Ait Bulgular	118
3.3.6.2. Filmlerin SEM ile Görüntülenmesine Ait Bulgular	119
3.3.6.3. Filmlerin Mikro-BT ile Görüntülenmesine Ait Bulgular	120
3.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular	123
3.4.1. Nanopartikül Formülasyonlarında DSC Analizine Ait Bulgular	123
3.4.2. Nanopartikül Formülasyonlarında Partikül büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Bulguları	124
3.4.3. Nanopartiküllerin % Verim ve % İşlem Etkinliği Ait Bulgular	126
3.4.4. Nanopartiküllerin <i>In vitro</i> Çözünme Hızı Deneyine Ait Bulgular	127

3.4.4.1. Nanopartiküllerin <i>In vitro</i> Salım Kinetiğine Ait Bulgular	134
3.4.5. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi ne Ait Bulgular	134
3.4.5.1. Nanopartiküllerin SEM ile Görüntülenmesine Ait Bulgular	134
3.4.5.2. Nanopartiküllerin Mikro-BT ve Nano-BT ile Görüntülenmesine Ait Bulgular	137
3.5. Nanopartikül-Film ve Nanopartikül-Greft Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular	145
3.5.1. Kombinasyon Formülasyonlarının <i>In vitro</i> Çözünme Hızı Deneylerine Ait Bulgular	145
3.5.1.2. Kombinasyon Formülasyonlarının <i>In vitro</i> Salım Kinetiklerine Ait Bulgular	148
3.5.2. Kombinasyon Formülasyonlarının SEM ve Mikro-BT ile Görüntülenmelerine Ait Bulgular	148
3.6. Formülasyonların <i>In vivo</i> Etkinliğine Ait Bulgular	150
3.6.1. Dokuların Mikro-BT Analizine Ait Bulgular	150
3.6.2. Dokuların Patomorfolojik Analizlerine Ait Bulgular	155
4. TARTIŞMA	157
4.1. Etken Maddeler Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	157
4.1.1. Klindamisin Fosfat Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	157
4.1.2. BMP Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	158
4.2. Film Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	159
4.2.1. Kitozan Filmlerin Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	159
4.2.2. Aljinat Filmlerin Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	162
4.2.3. Aljinat-Kitozan Kompleks Filmlerin Hazırlanması ve Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	164
4.2.3.1. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarında DSC ve FTIR Analizlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	166
4.2.3.2. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarında Viskozite, Kalınlık, İşlem Etkinliği, Yüzey Özellikleri ve Şişme Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	167
4.2.3.3. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarının Mikro-BT ile Yapısal Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	169
4.2.3.4. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarının <i>In vitro</i> Adezif Özelliklerin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	170
4.2.3.5. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarının <i>In vitro</i> Çözünme Hızı ve <i>In vitro</i> Salım Kinetiklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	172
4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	176
4.3.1. Nanopartiküllerde Etken Madde ve Yardımcı Maddelerin Etkileşiminin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	183
4.3.2. Nanopartiküllerde <i>In vitro</i> Çözünme Hızı Deneyine ve Salım Kinetiklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	183

4.3.3. Nanopartiküllerin Görüntülenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	186
4.4. Nanopartikül-Film ve Nanopartikül-Greft Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	188
4.4.1. Kombinasyon Formülasyonlarının <i>In vivo</i> Deney Bulgularının Değerlendirilmesi	190
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	196
ÖZET	199
SUMMARY	200
EKLER	219
Ek 1. Hayvan Deneyi Yerel Etik Kurul Kararı	219
Ek 2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	220
ÖZGEÇMİŞ	221



ÖNSÖZ

Bu çalışmada antibiyotik ve büyüme faktörü yüklü nanopartikül, film, nanopartikül yüklü film ve nanopartikül yüklü greft formülasyonları hazırlanmış ve *in vitro* ve *in vivo* değerlendirilmiştir. Deneyler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Lisans ve lisansüstü öğrenimim süresince bilgilerinden, akademik deneyimlerinden yararlandığım, çalışma azmi ve disiplini ile bana her zaman örnek olan, hiç bitmeyen her anlamdaki ilgi ve desteği ile her zaman yanımda olduğunu bildiğim, birlikte çalışmaktan onur duyduğum danışman hocam sayın Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Katkılarından dolayı başta tez izleme komitesinde yer alan saygıdeğer hocalarım sayın Prof. Dr. Asuman BOZKIR, sayın Prof. Dr. Kaan ORHAN ve Doç. Dr. Nilsun BAĞIŞ'a, tez çalışmalarım süresince bana her türlü kolaylığı göstererek laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan ve her konuda yardımcı olan başta Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR olmak üzere tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

In vivo çalışmalarımda bana yardımcı olan ve önemli katkılar sağlayan sayın Doç. Dr. Nilsun BAĞIŞ ve Doç. Dr. Okan EKİM'e ve Ankara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nın tüm ekibine, mikro bilgisayarlı tomografi ile üç boyutlu görüntü analizlerinde bana her türlü desteği sağlayan ve sabrı gösteren başta sayın Prof. Dr. Kaan ORHAN olmak üzere, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekan Yardımcısı sayın Prof. Dr. Mehmet Ali KILIÇARSLAN'a, sayın Doç. Dr. Burak BİLECENOĞLU'na, sayın Öğr. Gör. Dr. Mert OCAK'a, sayın Dr. Arda BÜYÜKSUNGUR'a ve ayrıca histopatoloji deneylerinde bana önemli katkılar sağlayan sayın Dr. Öğr. Üye. Eray ALÇIĞIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her anlamda gösterdikleri ilgi ve destekten dolayı başta sevgili hocam Dr. Öğr. Üye. Özge İNAL olmak üzere, çalışma arkadaşlarım Ecz. Özge EŞİM, Dr. Ecz. Tuğba EREN BÖNCÜ, Dr. Ecz. Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN, Dr. Ecz. Gülin AMASYA, Dr. Ecz. Ahmet Doğan ERGİN, Ecz. Gizem Rüya TOPAL, Dr. Ecz. Aslıhan Hilal ALGAN, Ecz. Sema ARISOY, Dr. Ecz. Umut Can ÖZ, Ecz. Mert SERİM, Ecz. Ayşe Nur BÜKE'ye, çok değerli dostum Ecz. Ayşenur OKTAY'a ve ayrıca Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine teşekkür ederim.

Araştırmalarımızda SEM analizi yaptığımız ODTÜ Merkez Laboratuvarı ve Bilkent UNAM'a, FTIR çekimlerinde bize destek olan Uzm. Dr. Nilüfer VURAL'a teşekkür ederim.

Bana verdikleri sonsuz sevgi ve duydukları güvenle güç kaynağım olan en büyük manevi desteklerim annem ve babam Serpil-İsmail GÖRGÖZ'e, ablam Selcen BEKTAŞ'a, kardeşlerim İrem ve Melih GÖRGÖZ'e, sevgili kayınvalidem Nazan İLHAN'a ve hem akademiye hem hayatta yol arkadaşım, canım eşim Dr. Ecz. Mert İLHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu tez çalışmasını 17A0234001 nolu alt yapı projesi ve 17H0237006 nolu hızlı destek projesi ile destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

3D	Üç boyutlu (3 dimensional)
2D	İki boyutlu (2 dimensional)
BCA	Bikinkoninik asit (Bicinchoninic acid)
BMP	Kemik morfogenetik protein (Bone morphogenetic protein)
BSA	Bovin serum albumin
BT	Bilgisayarlı tomografi
DCM	Diklorometan
DSC	Ayrımsal taramalı kalorimetri (Differential scanning calorimetry)
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent deneyi (Enzyme linked immunosorbent assay)
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy)
HC	Yüksek molekül ağırlıklı kitozan
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (High performance liquid chromatography)
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı (International conference on harmonization)
KF	Klindamisin fosfat
LC	Düşük molekül ağırlıklı kitozan
LOD	Teşhis alt sınırı (Limit of detection)
LOQ	Tayin alt sınırı (Limit of quantitation)
MA	Molekül ağırlığı
MC	Orta molekül ağırlıklı kitozan
PDI	Polidispersite indeksi
PEC	Polielektrolit kompleks
PG	Propilen glikol
PLGA	Poli laktik-ko-glikolik asit
PVA	Poli vinil alkol
r^2	Determinasyon katsayısı

ROI	İlgi bölgesi (Region of interest)
SCF	Süperkritik akışkan (Supercritical fluid)
SEM	Taramalı elektron mikroskopu (Scanning electron microscopy)
SH	Standart hata
SMI	Yapısal model indeksi (Structural model index)
SS	Standart sapma
VOI	İlgi hacmi (Volume of interest)



ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. Diş ve çevre dokularının şematik gösterimi	3
Şekil 1. 2. Greft materyalinin implant öncesinde alt çene kemiğine yerleştirilmesi (a) ve dental implant (b)	4
Şekil 1. 3. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu prensibinin şematik gösterimi	5
Şekil 1. 4. Büyüme faktörünün taşıyıcı sisteme yükleme stratejileri ve bu sistemlerin kıyaslanmaları	13
Şekil 1. 5. Sütür liflerinin matris içerisinde düzgün yerleştirilmesi (a) ve rastgele dağıtılmasının (b) şematik gösterilişi	16
Şekil 1. 6. Preosteoblast hücreleri tarafından normal ve osteokondüktif ortamda biriken inorganik kalsiyumun 14. gündeki optik görüntüleri	17
Şekil 1. 7. BMP-2/D-NP hidrojelinden BMP-2 salım profili (a) ve <i>in vivo</i> deney sonucu elde edilmiş kemik hacimleri (b)	18
Şekil 1. 8. Mikro-BT analizi ile kemik dokusundaki (a) trabeküler kalınlık (Tb.Th) ve (b) trabeküler sayısının (Tb.N) değişimin grafik olarak gösterimi	22
Şekil 1. 9. PEC-filmlerin antimikrobiyal aktivitesi	23
Şekil 1. 10. Bazı nano- ve mikroparikül hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi	25
Şekil 1. 11. X-ray biyogörüntüleme sistemi ile elde edilmiş ektopik kemik oluşumu görüntüleri	28
Şekil 1. 12. PCL ile nanopartiküllerin doku iskelesi ile birleştirilmesi	29
Şekil 1. 13. Hidroksiapatit iskelenin implantasyon sonrasındaki 8. hafta mikro-BT görüntüleri	29
Şekil 1. 14. Tabaka tabaka karma-kaplama	30
Şekil 1. 15. Kitozan (a) ve aljinatın (b) kimyasal yapısı	32
Şekil 1. 16. Standart masaüstü mikro-BT tarayıcısı	36
Şekil 1. 17. Trabeküler kalınlık (a) ve boşlukların (b) hesaplanmasında direkt 3D yöntemde kullanılan algoritmanın şematik gösterimi	36
Şekil 1. 18. Kalibrasyon için kullanılan hidroksiapatit fantom rodların yeniden yapılandırılmış mikro-BT görüntüleri (0,25 ve 0,75 gHAp cm ⁻³)	38

Şekil 1. 19. Halka artefaktı (a), metal artefaktı (b) ve hareket artefaktı (c)	38
Şekil 1. 20. BMP'nin yapısal organizasyonu	41
Şekil 1. 21. BMP-7'nin moleküler grafiği (monomerik (a) ve dimerik (b))	42
Şekil 1. 22. Klindamisin fosfatın kimyasal yapısı	44
Şekil 2. 1. BMP-7 kalibrasyonu için seyreltme serisi hazırlanışının şematik gösterimi	53
Şekil 2. 2. BSA kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması	54
Şekil 2. 3. Aljinat-kitozan kompleks film formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi	64
Şekil 2. 4. TA-XT Plus tekstür analiz cihazında film formülasyonunun yerleşimi	69
Şekil 2. 5. Bruker SkyScan 1275 Mikro-BT	71
Şekil 2. 6. Bruker SkyScan 1272 Mikro-BT	80
Şekil 2. 7. Bruker SkyScan Nano-BT	80
Şekil 2. 8. Deneysel dejeneasyon işlemi sırasında mandibulanın işleme hazır hale getirilmesi (a ve b), frez ile defektin oluşturulması (c) ve mandibulada oluşmuş defekte (d) ait görüntüler	84
Şekil 2. 9. Film formülasyonunun (a) ve toz haldeki formülasyonların (b ve c) defekte uygulanması	85
Şekil 2. 10. İkinci hafta sonunda çıkarılmış tüm mandibula (a) ve uygulama bölgesi (b)	86
Şekil 3. 1. Klindamisin fosfata ait DSC termogramı	89
Şekil 3. 2. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponu ortamındaki HPLC kromatogramı	90
Şekil 3. 3. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki kalibrasyonuna ait HPLC kromatogramları	91
Şekil 3. 4. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki kalibrasyon grafiği ve denklemi	91
Şekil 3. 5. Klindamisin fosfatın % 0,3 PVA ortamındaki kalibrasyonuna ait HPLC kromatogramları	92
Şekil 3. 6. Klindamisin fosfatın % 0,3 PVA çözeltisindeki kalibrasyon grafiği ve denklemi	92

Şekil 3. 7. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki %95 olasılıkla güven aralığı içinde yer aldığını gösteren kalibrasyon grafiği	96
Şekil 3. 8. BMP-7'nin ELISA kit analiz sertifikasında verilmiş olan kalibrasyonuna ait logaritmik grafik (RAB0033)	97
Şekil 3. 9. BMP-7'nin ELISA kit ile kalibrasyonuna ait logaritmik grafik	97
Şekil 3. 10. BMP-7'nin ELISA kit ile kalibrasyonuna ait doğru grafiği ve denklemi	98
Şekil 3. 11. BSA'nın BCA kit ile kalibrasyonuna ait grafik ve kalibrasyon denklemi	99
Şekil 3. 12. Kompleks film, etken madde ve polimerlere ait DSC termogramları	104
Şekil 3. 13. Klindamisin fosfat (a), orta molekül ağırlıklı kitozan (b), düşük molekül ağırlıklı kitozan (c), sodyum aljinat (d), AC15 (e), AC21 (f) ve AC18'e (g) ait FTIR spektrumları	105
Şekil 3. 14. Farklı konsatrasyonda asetik asit kullanılan orta molekül ağırlıklı kitozan filmlerin <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)	106
Şekil 3. 15. Farklı konnsatrasyonda asetik asit kullanılan yüksek molekül ağırlıklı kitozan filmlerin <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)	107
Şekil 3. 16. Düşük molekül ağırlıklı kitozan çözeltisi kullanılan formülasyonlarda farklı etken madde:polimer oranlarının <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızına etkisi ($n=3$)	107
Şekil 3. 17. Orta molekül ağırlıklı kitozan çözeltisi kullanılan formülasyonlarda farklı etken madde:polimer oranlarının <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızına etkisi ($n=3$)	108
Şekil 3. 18. Aynı derişimdeki (% 1 (a/h)) farklı molekül ağırlıklı kitozan çözeltilerinin kullanıldığı formülasyonlarda <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)	108
Şekil 3. 19. Düşük viskoziteli aljinat ile hazırlanan filmlerde etken madde: aljinat oranındaki artışın <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızına etkisinin karşılaştırılması ($n=3$)	109
Şekil 3. 20. Orta viskoziteli aljinat ile hazırlanan filmlerde etken madde:aljinat oranındaki artışın <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızına etkisinin karşılaştırılması ($n=3$)	109

Şekil 3. 21. 15 mL orta molekül ağırlıklı kitozan, 5 mL aljinat çözeltisinin karıştırılması ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks filmlerde toplam polimer miktarındaki artışın <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızına etkisi ($n=3$)	110
Şekil 3. 22. 15 mL düşük molekül ağırlıklı kitozan 5 mL aljinat çözeltisinin karıştırılması ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks filmlerde toplam polimer miktarındaki artışın <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızına etkisi ($n=3$)	110
Şekil 3. 23. 15 mL aljinat 5 mL orta molekül ağırlıklı kitozan çözeltisinin karıştırılması ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks filmlerde toplam polimer miktarındaki artışın <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızına etkisi ($n=3$)	111
Şekil 3. 24. 15 mL aljinat 5 mL düşük molekül ağırlıklı kitozan çözeltisinin karıştırılması ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks filmlerde toplam polimer miktarındaki artışın <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızına etkisi ($n=3$)	111
Şekil 3. 25. Orta molekül ağırlıklı kitozanın derişiminin sabit (% 1 (a/h)) tutulduğu aljinat-kitozan kompleks filmlerde karışıma giren polimer hacimlerindeki değişimin <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızlarına etkisinin karşılaştırılması ($n=3$)	112
Şekil 3. 26. Düşük molekül ağırlıklı kitozanın derişiminin sabit (% 1 (a/h)) tutulduğu aljinat-kitozan kompleks filmlerde karışıma giren polimer hacimlerindeki değişimin <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızlarına etkisinin karşılaştırılması ($n=3$)	112
Şekil 3. 27. Aljinat derişiminin sabit (% 1 (a/h)) tutulduğu orta molekül ağırlıklı kitozanın farklı oranlarda kullanıldığı aljinat-kitozan kompleks filmlerde karışıma giren polimer hacimlerindeki değişimin <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızlarına etkisi ($n=3$)	113
Şekil 3. 28. Aljinat derişiminin sabit (% 1 (a/h)) tutulduğu düşük molekül ağırlıklı kitozanın farklı oranlarda kullanıldığı aljinat-kitozan kompleks filmlerde karışıma giren polimer hacimlerindeki değişimin <i>in vitro</i> etken madde çözünme hızlarına etkisi ($n=3$)	113
Şekil 3. 29. Tekstür analiz cihazı ile mukoadazyon testi sonucunda elde edilen eğri	116
Şekil 3. 30. Aljinat-kitozan kompleks film formülasyonlarına ait optik mikroskop görüntüleri (Kilicarslan ve ark., 2018)	118
Şekil 3. 31. AC15 (5 mL % 2 aljinat ve 15 mL % 2 orta molekül ağırlıklı kitozan) kompleks film formülasyonuna ait SEM görüntüsü	119
Şekil 3. 32. AC21 (15 mL % 2 aljinat ve 5 mL % 2 orta molekül ağırlıklı kitozan) formülasyonuna ait SEM görüntüsü	120
Şekil 3. 33. AC 15 (a ve b) ve AC18 (c ve d) formülasyonlarına ait 3D Mikro-BT görüntüleri (Kilicarslan ve ark., 2020).	121

Şekil 3. 34. AC21 kompleks film formülasyonunun Mikro-BT ile görüntülenmesi: film örneğinin aksenal dilimi (a), tüm numuneleri içeren ROI seçimi (a.i ve a.ii), görüntünün gri seviye histogramı ile binarize edilmesi (a.iii), analiz için eşikleme (a.iv), tüm ayarlamalardan sonra 3D Mikro-BT görüntüleri (b) (Kilicarslan ve ark., 2018)	122
Şekil 3. 35. AC33 film formülasyonuna ait Mikro-BT görüntüsü	123
Şekil 3. 36. Nanopartikül, PLGA ve etken maddelere ait DSC termogramı	124
Şekil 3. 37. N11 (ana formülasyon) ve N12 (iç su fazının 0,5 mL'ye düşürüldüğü formülasyon) formülasyonlarına ait <i>in vitro</i> klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)) ($n=3$)	128
Şekil 3. 38. İç su fazının değiştirilmesi ile hazırlanmış formülasyonlara ait <i>in vitro</i> klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)). (N11 (ana formülasyon), N12 (iç su fazı 0,5 mL), N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılan formülasyon) ve N25 (klindamisin fosfatın metanolde dağıtıldığı formülasyon)) ($n=3$)	129
Şekil 3. 39. Dış su fazının pH'sının değiştirilmesi ile hazırlanmış formülasyonlara ait <i>in vitro</i> klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)). (N11 (pH 6,95), N17 (pH 10), N18 (pH 12)) ($n=3$)	130
Şekil 3. 40. Kullanılan polimerin değiştirilmesi ile hazırlanmış formülasyonlara ait <i>in vitro</i> klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)). (N11 (24-38 kDa PLGA), N15 (PCL), N29 (7-17 kDa ve 24-38 kDa PLGA)) ($n=3$)	131
Şekil 3. 41. N17 (sadece klindamisin fosfat içeren (% 0,3 PVA, pH 10)) ve NBSA4 (hem klindamisin fosfat hem de BSA içeren (% 0,3 PVA, pH 10)) formülasyonlara ait <i>in vitro</i> klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)) ($n=3$)	132
Şekil 3. 42. NBSA3 (sadece BSA içeren formülasyon) ve NBSA4 (klindamisin fosfat ve BSA'yı bir arada içeren formülasyon) formülasyonlarına ait <i>in vitro</i> BSA çözünme hızı grafikleri ($n=3$)	133
Şekil 3. 43. NBSA4 (hem BSA hem klindamisin fosfat içeren nanopartikül) formülasyonundan klindamisin fosfat ve BSA çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)	133
Şekil 3. 44. N11 (iç su fazı 1 mL, dış su fazı % 0,3 PVA ile hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)	135
Şekil 3. 45. N12 (iç su fazı 500 µL olacak şekilde hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)	135

Şekil 3. 46. N15 (PCL ile hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)	135
Şekil 3. 47. N18 (dış faz pH'sı 12 olarak ayarlanarak hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)	136
Şekil 3. 48. N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılarak hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)	136
Şekil 3. 49. N25 (klindamisin fosfatın metanolde dağıtılmasıyla hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)	136
Şekil 3. 50. N34 (klindamisin fosfat ve BMP-7 yi birarada içeren) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1300, x3000, x50000)	137
Şekil 3. 51. N3 (dış su fazı % 0,1 PVA) ve N11 (dış su fazı % 0,3 PVA) formülasyonlarına ait Mikro-BT görüntüleri (a ve c genel görüntü, b ve d yakınlaştırılmış görüntüler)	137
Şekil 3. 52. N12 (iç su fazı 500 µL olacak şekilde hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 2D aksinel kesiti	138
Şekil 3. 53. N12 (iç su fazı 500 µL olacak şekilde hazırlanmış) formülasyonuna ait 3D Nano-BT görüntüsü	138
Şekil 3. 54. N12 (iç su fazı 500 µL olacak şekilde hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT görüntüsü (İlgi alanı belirlenmesi (a) rastgele seçilmiş bir partikülün 2D özelliklerine bakılması (b) ve yine tek partikülün 3D görüntüsü (c))	139
Şekil 3. 55. N15 (PCL ile hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 2D aksinel kesit	140
Şekil 3. 56. N15 (PCL ile hazırlanmış) formülasyonuna ait 3D Nano-BT görüntüsü	140
Şekil 3. 57. N18 (dış faz pH'sı 12 olarak ayarlanarak hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 2D aksinel görüntü	141
Şekil 3. 58. N18 (dış faz pH'sı 12 olarak ayarlanarak hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 3D görüntüsü	141
Şekil 3. 59. N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılarak hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 2D aksinel kesit görüntüsü	142

Şekil 3. 60. N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılarak hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 3D görüntüsü	142
Şekil 3. 61. N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılarak hazırlanmış) formülasyonuna ait nano-BT 2D aksenal görüntüsünün boyuta göre renklendirilmesi	143
Şekil 3. 62. N25 (klindamisin fosfatın metanolde dağıtılmasıyla hazırlanmış) formülasyonuna ait nano-BT 2D aksenal görüntüsü	143
Şekil 3. 63. N25 (klindamisin fosfatın metanolde dağıtılmasıyla hazırlanmış) formülasyonuna ait nano-BT 3D görüntüsü	144
Şekil 3. 64. Nanopartikül-film kombinasyon formülasyonlarına ait <i>in vitro</i> çözünme hızı grafikleri (NF1: Film+BSA yüklü nanopartikül; NF2: Film+BSA ve klindamisin fosfat yüklü nanopartikül) ($n=3$)	145
Şekil 3. 65. Nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonlarına ait <i>in vitro</i> çözünme hızı grafikleri (NG1, Greft+BSA yüklü nanopartikül; NG2, Greft+BSA ve klindamisin fosfat yüklü nanopartikül) ($n=3$)	146
Şekil 3. 66. NG2 ((hem BSA hem klindamisin fosfat içeren nanopartikül yüklü greft) formülasyonundan klindamisin fosfat ve BSA çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$))	146
Şekil 3. 67. Kombinasyon formülasyonları (BSA yüklü NF1 ve NG1) ve kombinasyon formülasyonlarında kullanılmış olan nanopartiküle (NBSA3) ait çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)	147
Şekil 3. 68. Kombinasyon formülasyonları (BSA ve klindamisin fosfat yüklü NF2 ve NG2) ve kombinasyon formülasyonlarında kullanılmış olan nanopartiküle (NBSA4) ait çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)	147
Şekil 3. 69. Tek başına sentetik greft materyali (a-c) ve NG2 (klindamisin fosfat ve BMP-7 içeren nanopartikül ile greft kombinasyonu) formülasyonuna (d-f) ait SEM görüntüleri	149
Şekil 3. 70. Tek başına greft (a), nanopartikül-greft kombinasyonu (b) ve nanopartikül-greft kombinasyonunun yakınlaştırılmış (c) mikro-BT görüntüsü	150
Şekil 3. 71. NF2 (klindamisin fosfat ve BMP7 içeren nanopartikülün filmle kombinasyonu) formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x60, x500, x13000)	150
Şekil 3. 72. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-1: Mandibulanın aksenal dilimi ve defektin tüm eksenlerden gözlenmesi	151
Şekil 3. 73. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-2: Mandibulanın aksenal dilimi ve defektin gözlenmesi	152

Şekil 3. 74. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-3: Sadece defektli bölgeyi içeren ROI seçimi	152
Şekil 3. 75. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-4: Görüntünün gri seviye histogramı ve eşiklenmesi	153
Şekil 3. 76. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-5: Oluşan yeni kemik dokusunun tüm mandibuladan ayrılarak görüntülenmesi ve hacminin hesaplanması	153
Şekil 3. 77. Mandibulanın mikro-BT ile hazırlanmış 3D görüntüsü (a) ve kemik iyileşmesinin 3D görüntü üzerinde gözlenmesi (b) (Görüntü, defektli bölgeye klindamisin fosfat ve BMP-7'yi birarada içeren N34 nanopartikül formülasyonu uygulanmış rat mandibulasına aittir.)	154
Şekil 3. 78. Deney gruplarına göre histopatolojik bulgular	156

ÇİZELGELER

Çizelge 1. 1. Büyüme faktörlerinin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaları	9
Çizelge 1. 2. Mikro-BT tarama doğruluğu için anahtar parametreler	37
Çizelge 1. 3. Önemli üç boyutlu morfometrik parametrelerin tanımları	38
Çizelge 1. 4. <i>In vivo</i> mikro-BT, <i>in vitro</i> mikro-BT ve nano-BT teknik özellikleri	39
Çizelge 1. 5. Memelilerdeki BMP süperfamilyası	41
Çizelge 2. 1. Klindamisin fosfatın HPLC ile yapılan miktar tayini çalışma parametreleri	51
Çizelge 2. 2. Etken madde ve plastizer içermeyen film formülasyonları	60
Çizelge 2. 3. Farklı asetik asit yüzdesi ve farklı molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanmış film formülasyonları	60
Çizelge 2. 4. Orta molekül ağırlıklı kitozanın artan miktarı ile hazırlanan formülasyonlar	60
Çizelge 2. 5. Düşük molekül ağırlıklı kitozanın artan miktarı ile hazırlanan formülasyonlar	61
Çizelge 2. 6. Düşük viskoziteli (250 cPs) aljinatın artan miktarı ile hazırlanan formülasyonlar	62
Çizelge 2. 7. Orta viskoziteli (≥ 2000 cPs) aljinatın artan miktarı ile hazırlanan formülasyonlar	62
Çizelge 2. 8. Klindamisin fosfat içermeyen sadece prob sonikatör kullanılarak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları	63
Çizelge 2. 9. Klindamisin fosfat içermeyen prob sonikatör sonrasında UltraTurrax kullanılarak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları	63
Çizelge 2. 10. Klindamisin fosfat içeren ve eşit hacimde polimer çözeltisi ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları	64
Çizelge 2. 11. Yüksek hacimde kitozan çözeltisi kullanılarak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları	64
Çizelge 2. 12. Yüksek hacimde aljinat çözeltisi kullanılarak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları	65

Çizelge 2. 13. Kitozan çözeltisi derişimi sabit tutularak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları	65
Çizelge 2. 14. Sodyum aljinat çözeltisi derişimi sabit tutularak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları	65
Çizelge 2. 15. Adezyon testi koşulları	69
Çizelge 2. 16. Mikro-BT ile film formülasyonlarının tarama koşulları	71
Çizelge 2. 17. % 1, % 3 ve % 0,1 (a/h) PVA çözeltisi ile hazırlanmış nanopartiküller	74
Çizelge 2. 18. % 0,2 (a/h) PVA çözeltisi ile hazırlanmış nanopartiküller	74
Çizelge 2. 19. % 0,3 (a/h) PVA çözeltisi ile hazırlanmış nanopartiküller	74
Çizelge 2. 20. Farklı pH değerlerinde % 0,3 (a/h) PVA çözeltisi ile hazırlanmış nanopartiküller	75
Çizelge 2. 21. Etken madde miktarının değiştirilmesi ile elde edilmiş nanopartiküller	75
Çizelge 2. 22. Yağ fazı veya su 1 fazının değiştirilmesi ile elde edilen nanopartiküller	75
Çizelge 2. 23. Su 2 fazının değiştirilmesi ile elde edilen nanopartiküller	76
Çizelge 2. 24. Çift polimer tabakalı (s/y/y/s ve s/y/s(kitozan)) nanopartiküller	76
Çizelge 2. 25. BSA ve BSA - klindamisin fosfat yüklü nanopartiküller	77
Çizelge 2. 26. BMP ve BMP - klindamisin fosfat yüklü nanopartiküller	77
Çizelge 2. 27. Mikro-BT ve nano-BT ile nanopartikül formülasyonlarının tarama koşulları	80
Çizelge 2. 28. Nanopartikül-film ve nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonları	82
Çizelge 2. 29. <i>In vivo</i> deney grupları	84
Çizelge 2. 30. Mikro-BT ile rat mandibulalarının tarama koşulları	86
Çizelge 3. 1. Klindamisin fosfatın farklı ortamlardaki kalibrasyon parametreleri	92
Çizelge 3. 2. Klindamisin fosfatın miktar tayini yöntemlerinin doğruluk ve geri eldesine ait bulgular	93
Çizelge 3. 3. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin bulgular	94

Çizelge 3. 4. Klindamisin fosfatın % 0,3 PVA çözeltisindeki miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin bulgular	95
Çizelge 3. 5. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki ve % 0,3 PVA çözeltisindeki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırlarına ilişkin bulgular	96
Çizelge 3. 6. BMP-7'nin ELISA yöntemi ile validasyonuna ait bulgular (RAB0033)	98
Çizelge 3. 7. Kitozan ile hazırlanan formülasyonların viskozluk, kalınlık ve ağırlık değerleri	100
Çizelge 3. 8. Aljinat ile hazırlanan formülasyonların viskozluk, kalınlık ve ağırlık değerleri	100
Çizelge 3. 9. Aljinat-kitozan kompleksi ile hazırlanan formülasyonların viskozluk, kalınlık ve ağırlık değerleri	101
Çizelge 3. 10. Kitozan film formülasyonlarına ait % işlem etkinliği ve ikinci saat şişme verileri	102
Çizelge 3. 11. Aljinat film formülasyonlarına ait % işlem etkinliği verileri	102
Çizelge 3. 12. Aljinat-kitozan kompleks film formülasyonlarına ait % işlem etkinliği verileri	103
Çizelge 3. 13. AC14-AC20 formülasyonlarına ait <i>in vitro</i> salım kinetikleri	114
Çizelge 3. 14. AC21-AC27 formülasyonlarına ait <i>in vitro</i> salım kinetikleri	114
Çizelge 3. 15. AC28-AC34 formülasyonlarına ait <i>in vitro</i> salım kinetikleri	115
Çizelge 3. 16. AC35-AC41 formülasyonlarına ait <i>in vitro</i> salım kinetikleri	115
Çizelge 3. 17. Aljinat-kitozan kompleks film formülasyonlarının adezyon testi sonuçları ($n=3$)	117
Çizelge 3. 18. Aljinat-kitozan kompleks filmler için seçilmiş mikro-BT analiz parametreleri	123
Çizelge 3. 19. Nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri ($n=6$)	125
Çizelge 3. 20. Klindamisin fosfat yüklü nanopartiküllerin % verimi ve klindamisin fosfat için işlem etkinliği (% İE) ($n=3$)	126
Çizelge 3. 21. BMP veya BSA yüklü nanopartiküllerin % verimi ve BMP-7 ve BSA için işlem etkinliği (%İE) ($n=3$)	127

Çizelge 3. 22. <i>In vitro</i> çözünme hızı deneyleri gerçekleştirilen formülasyonlara ait <i>in vitro</i> salım kinetikleri	134
Çizelge 3. 23. Nanopartiküller için seçilmiş nano-BT analiz parametreleri	144
Çizelge 3. 24. <i>In vitro</i> çözünme hızı deneyleri gerçekleştirilen formülasyonlardan model etken madde olarak kullanılan BSA'nın <i>in vitro</i> salım kinetikleri	148
Çizelge 3. 25. Mikro-BT analizleri sonucu yeni oluşan kemik dokusu hacimleri	151
Çizelge 3. 26. Gruplara göre deneklerdeki makroskopik bulguların ortalama skorlaması	155
Çizelge 3. 27. Gruplara göre deneklerdeki histopatolojik bulguların ortalama skorlaması	155

1. GİRİŞ

Dişler, etrafını saran kemik doku ile desteklenmekte ve bu sayede yaşam boyu ağızdaki varlığını sürdürerek fonksiyon göstermektedir. Travma, enfeksiyon, tümör oluşumu, doğuştan mevcut olan sakatlıklar, patolojik veya fizyolojik sebepler ile dental kemik kaybı meydana gelebilmekte ve bu durum diş kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle dental cerrahi alanındaki çalışmalar, dişlerin etrafındaki kemik kaybını engellemek ve kaybolan kemiği yeniden kazanmak (rejenerasyon) üzerine yoğunlaşmıştır. Kemik rejenerasyonunu desteklemek ve güçlendirmek üzere bireyin kendisinden elde edilen (otojen) materyallerin kullanımı altın standart olsa da, yeterli materyal elde edilmesindeki güçlükler, ikinci cerrahi sahaya ihtiyaç duyulması, hasta morbiditesi gibi nedenler otojen doku kullanımını sınırlamış ve araştırmacıları kemik rejenerasyonunu destekleyecek materyallerin (greft/membran) hazırlanmasına yönlendirmiştir. Doku ile iyi uyumlanmasının yanı sıra, defekt bölgesini desteklemesi ve hücre farklılaşmasına yardımcı olması, yeni kemik yapımını desteklemesi, uygulama sahasını enfeksiyondan koruması beklentilerini karşılayan materyallerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Son yıllarda, kemik rejenerasyonunda önemli rolleri olan büyüme faktörleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmış ancak, kısa yarı ömürleri, uygulama zorlukları ve ancak yüksek doz büyüme faktörü varlığında biyoaktivitesinin sağlanabilmesi gibi nedenlerle kullanımları sınırlı kalmıştır. Bunun yanında, rejeneratif tedavi sonrası iyileşmenin aksamaması ve ideal rejenerasyon sağlanması için enflamatuvar cevabın kontrol altına alınabilmesi ve sahada mikroorganizma oluşumunun engellenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, rejeneratif büyüme faktörleri ile birlikte tedavilerde antimikrobiyallerin kullanımı ile konak cevabının module edilmesi önerilmektedir. Özellikle klindamisin fosfat, periodontitis gibi dental kemik kaybı ile karakterize hastalıkların tedavisinde sistemik olarak sıkça kullanılan antimikrobiyal etken maddelerdendir.

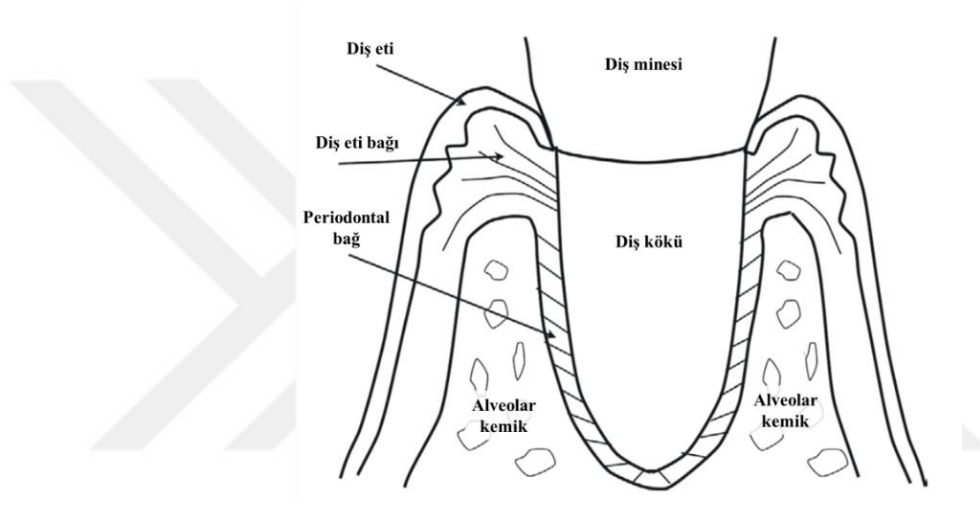
Tedavideki bu gereksinimlerden dolayı, araştırmamızda kemik morfogenetik proteini (BMP-7) ve klindamisin fosfatı tek ilaç şekli içinde içeren formülasyonların hazırlanması ile rejenerasyonun artırılabilceği dűřünülműřtür. Bu amaçla, çalışmamızda klindamisin fosfat ve/veya büyüme faktörü yüklü polimerik nanopartikűllerin hazırlanması, hazırlanmış partikűllerin klinikte uygulamasının kolaylaştırılması için de polimerik film veya greft ile kombinasyonlarının hazırlanması planlanmıştır.

1.1. Kemik Dokusu ve Kemik Dejenerasyonu

Kemik, vücudun destekleyici yapısı, mineral deposu ve kan hücrelerinin üretildiği dokudur. Hayati organları korur ve vücudun asit-baz dengesinin korunmasına yardımcı olur (De Witte ve ark., 2018). Kemik dokusu temel olarak kemik yapıcı hücreler, organik kollajen ve inorganik hidroksi karbonat apatitten meydana gelmektedir (Hench ve ark., 2014). Kemik, osteoblast ve osteoklast hücreleri sayesinde sürekli olarak yapım-yıkım döngüsü içerisinde olan, kendi kendini onarma ve yenileme kapasitesine sahip eşsiz bir organdır ve kontrollü büyüme ile birlikte mekanik uyarılara ve hasarlanmaya cevap olarak rejenerasyon kapasitesini sürekli olarak korumaktadır (Hu ve Olsen, 2016; Rodan ve Martin, 2000; Tang ve ark., 2016). Fakat, çok sayıda travmatik yaralanma veya osteoartrit, osteoporoz, osteojenez imperfekta, Paget hastalığı gibi bazı patolojik bozukluklar nedeniyle meydana gelen demineralizasyon, kollajen yapıdaki değişimler, kollajen miktarı veya kalitesindeki azalma sonucu kemiğin normal işlevi bozulabilmektedir (Hench ve ark., 2014; Kilicarslan ve Gorgoz, 2016). Bu bozukluklar, birleşmeyen kemik kırıklarına, kemik deformasyonuna, şiddetli ağrıya ve hareketlilik kaybına neden olmaktadır (Farokhi ve ark., 2016). Bu fiziksel veya patolojik dejenerasyonlar sonucu meydana gelen kemik hasarları ve sakatlıkları da popűlasyonun artması ile birlikte gün geçtikçe artmaktadır (Esteban-Tejeda ve ark., 2016).

1.2. Diş, Dişi Destekleyen Çevre Dokular ve Yaygın Hastalıkları

Periodontal doku (periodonsiyum); diş eti, diş yuvasını oluşturan alveolar kemik, diş kökünü kaplayan diş sementi ve dişi alveolar kemiğe bağlayan periodontal bağdan oluşmaktadır (Şekil 1.1). Periodontiyumun görevleri, dişlerin çeneye tutunmasını sağlaması, diş ile ağız mukozası arasında sızdırmazlığın sağlanması, okluzal (ısıırma) kuvvetin emilmesi, çene içinde diş hareketine izin vermesi olarak sıralanabilir (Hughes, 2015; Sowmya ve ark., 2013).

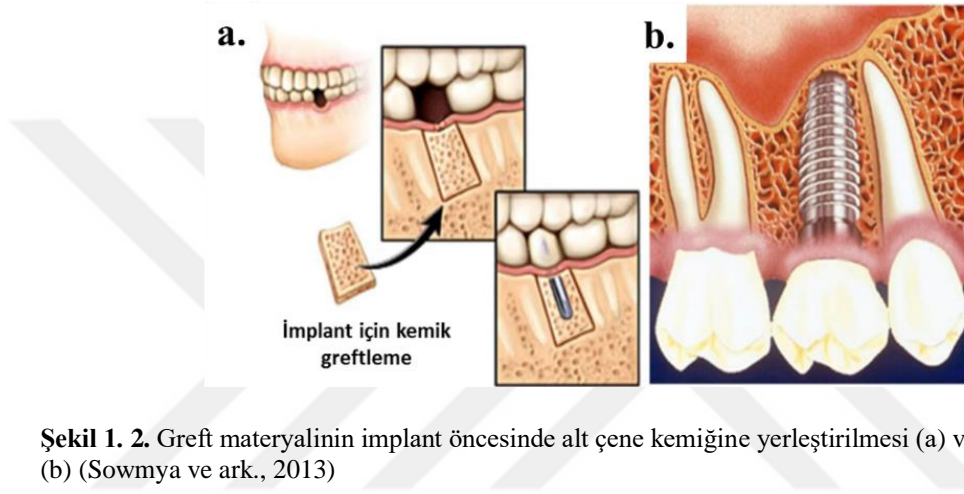


Şekil 1. 1. Diş ve çevre dokularının şematik gösterimi (Hughes, 2015)

Yaygın olarak görülen dental hastalıklar diş çürüğü, apikal apse, dişlerde aşınma ve yıpranma olarak sınıflandırılabilir. Periodontal hastalıklar da kronik ve agresif periodontitis, periodontal apse, nekrotizan periodontal diş eti iltihabı olarak sıralanabilir (Laudenbach ve Simon, 2014).

Ağız içi hastalıklarının temel nedeni ağız hijyeninin düzenli olarak sağlanamaması, sonrasında da bakterilerin dişlerde çürümeyi ve yumuşak dokuda da yangıyı tetikleyen biyofilm oluşturmasıdır. Bu sürecin devam etmesi sonucunda ağız içinde oluşan yangılı yumuşak doku hastalıkları da, alveolar kemik ve daha sonrasında diş kaybına doğru giden yıkıcı bir süreci tetiklemektedir (Laudenbach ve Simon, 2014; Oz ve ark., 2019).

Alveolar kemik, periodontal hastalık insidansının yüksek olması nedeniyle özellikle iltihap kaynaklı kemik rezorpsiyonuna hassastır. İleri düzeydeki periodontal hastalık alveolar kemik morfolojisini değiştirir ve dişi çevreleyen destekleyici dokuları tahrip eder ve sonuç olarak dişin çekilmesi gerekir. Diş çekimi sonrası kalan kemiğin korunması, yenilenmesi ve diş implantının yerleştirilmesi için zemin hazırlanması amacıyla kemik greftleme klinik olarak uygulanabilir bir yaklaşımdır (Şekil 1.2) (Pilipchuk ve ark., 2015).



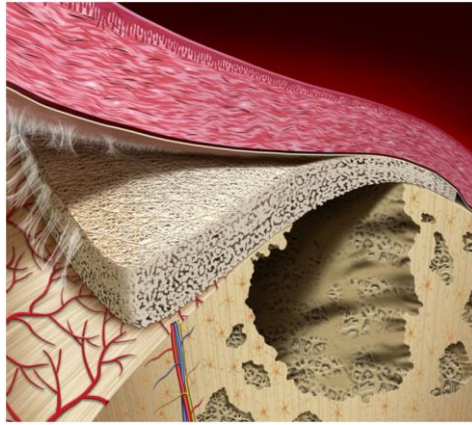
Şekil 1. 2. Greft materyalinin implant öncesinde alt çene kemiğine yerleştirilmesi (a) ve dental implant (b) (Sowmya ve ark., 2013)

Cerrahi müdahale gerektiren birçok diş hastalığının hızlıca tamamlanabilmesi ve uygulanmış olan tedavinin sonuçlarının uzun süre hastaya rahatsızlık vermeden devam edebilmesi tedavi etkinliği açısından oldukça önemlidir. Örneğin, diş implantlarının uzun süre dayanıklı olabilmesi için başta kaybolan alveolar kemiğin yeniden yapılanması daha sonra da implant ile ağız içindeki yumuşak ve sert dokunun birleşip bütünleşmesi (osteointegrasyon) gerekmektedir (Oh ve ark., 2002). Bu aşamada devreye rejeneratif tedavi yaklaşımları girmektedir. Başarılı bir periodontal rejenerasyon tedavisi için bağ epiteli sabitlenmeli, yeni bağ dokusu lifleri eklenmeli, yeni sement oluşturulmalı ve alveolar kemiğin yenilenmesi sağlanmalıdır. Tedavideki ana amaç dişi destekleyen dokuların enfeksiyon riskini azaltıp anatomik olarak hasarlı olan bölgeyi doğru şekilde belirleyerek rejenerasyonu sağlamaktır (Carvalho ve ark., 2013).

1.3. Periodontal Rejeneratif Tedavi Yaklaşımları

Yenilenme (rejenerasyon), organizmada yıkılmış doku veya hücrelerin yerine, aynı morfolojik yapıda ve aynı işi gören, doğal yollarla yeni bir doku veya hücrenin oluşması olarak tanımlanmaktadır (Yeşilada ve ark., 2015). Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu, kaybedilmiş periodontal yapıları farklı hızlardaki doku tepkileriyle yeniden üretmeye çalışan işlemler olarak tanımlanırken, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu alveolar kemiğin büyütülmesi ve kemiğin yenilenmesi işlemlerini kapsar (Jacob, 2017).

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu işlemi sırasında hasarlı kemik dokusunun yumuşak doku ile olan bağlantısı bir bariyer membran ile kesilir (Saka ve ark., 2018) (Şekil 1.3). Bu membran yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu için zorunludur ve genellikle biyolojik olarak emilebilir, biyouyumlu, konak dokularla bütünleşebilen, klinikte kolay uygulanabilen ve yeterli fiziksel ve mekanik dayanıklılığa sahip olan materyallerdir.



Şekil 1.3. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu prensibinin şematik gösterimi (Elgali ve ark., 2017)

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu gerçekleştirilirken tedavi etkinliğinin sağlanabilmesi için membran greft materyalleri ile desteklenmelidir. Çünkü tek başına membran kullanıldığında basınca karşı yeterli mekanik dayanıklılığı gösterememekte ve yapısal bütünlüğünü koruyamamaktadır (Liu ve Kerns, 2014; Passos ve ark., 2019).

1.3.1. Rejenerasyon Tedavisinde Kemik Greftleri

Greft, diğerk bir deyişle yama, sözlük tanımıyla, doku veya organ naklinde kullanılan canlı doku parçası veya organdır (Yeşilada ve ark., 2015). Kemik greftleri de yıkıma uğramış kemik dokusunun yenilenmesini ve desteklenmesini sağlayan kemik dokusu veya kemik dokusuna benzer yapıdaki materyallerdir. İdeal bir kemik greftinin sağlaması gereken dört parametre vardır (Moore ve ark., 2001);

1. Osteointegrasyon (Kemik tümleşimi); lifli doku tabakası olmadan kemiğe kimyasal olarak bağlanabilme kabiliyeti,
2. Osteokondüksiyon; yüzeyinde kemiğin büyümesini destekleme becerisi,
3. Osteoindüksiyon; çevre dokudaki pluripotansiyel kök hücrelerin (kemik iliğindeki kök hücreler) osteoblastik bir fenotipe farklılaşmasını sağlama kabiliyeti,
4. Osteojenez; greft materyali içinde bulunan osteoblastik hücreler tarafından yeni kemik oluşumu.

Klinik olarak kullanımda olan farklı greft materyalleri bulunmaktadır. Greft materyali hastanın kendi dokusundan elde edilmişse otogreft, aynı türün bir ferdinden diğerine naklediliyorsa allogreft, farklı bir türden elde edilmişse ksenogreft, sentetik veya inorganik bir materyal ise alloplastik greft olarak adlandırılmaktadır (Shin ve ark., 2014).

Otogreftler kusurlu bölgede kemik rejenerasyonunu sağlamada etkilidir, çünkü gerekli osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif bileşenleri içermektedirler. Fakat hastanın kendisinden alındığı için miktarları çok sınırlıdır, iki kez cerrahi işlem gerektirir ve donör bölgesinde kanama, enfeksiyon ve kronik ağrı sık görülen problemlerdir. Otogreft yerine tercih edilen allogreft ve ksenogreftte immünolojik ret ve hastalık bulaşma riski oldukça yüksektir. Bu sebeple implantasyondan önce detaylı şekilde işlenmeleri gerekir fakat bunun sonucunda da osteojenik özelliklerinin çoğu kaybedilmekte ve klinik başarı azalmaktadır (Sowmya ve ark., 2013). Canlılardan elde

edilen greftlerle karşılaşılan problemler yüzünden son zamanlarda sentetik greftler araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

1.3.1.1. İmplant edilebilen Sentetik Kemik Greftleri ve Doku İskeleleri

Sentetik kemik greftleri, genellikle kalsiyum sülfat, kalsiyum fosfat, hidroksi apatit, silikon, alüminyum oksit, biyoaktif camdan oluşan, ve ideal kemik greftinin 4 özelliğinden sadece ikisini (osteointegrasyon ve osteokondüksiyon) taşıyan greftlerdir. Sentetik greftlerin biyouyumlu olması ve kemik oluşumuna ortam oluşturabilmesi gerekmektedir. Bunun yanı sıra mekanik olarak da kortikal ve süngerimsi kemiğın kuvvetine yakın bir kuvvete sahip olmalıdırlar. Sentetik kemik greftleri klinikte uygulama bölgesine göre toz, granül, pellet ve bloklar halinde kullanılmaktadır. Fakat bu materyallerin çoğunun antibiyotiklerle veya kemik oluşumunu destekleyici maddelerle kullanımı sınırlıdır. Ayrıca biyoaktif cam ve alüminyum oksit gibi materyallerin emilimi mümkün olmadığı için uygulama bölgesinden çıkarılması da mümkün olamamaktadır (Moore ve ark., 2001).

İmplant edilebilen sistemlere farklı bakış açısı getiren doku mühendisliğı de biyomateryal odaklı teknolojileri içermektedir. Bu teknolojiler ile de doku rejenerasyonu sağlayan hücreler için etki bölgesinde uygun ortamın sağlanabilmesi amaçlanmaktadır (Kim ve Tabata, 2015). Özellikle kemik dokusunun rejenerasyonu için doku mühendisliğinin ortaya çıkışı oldukça ümit vericidir. Doku mühendisliğı kapsamındaki en yaygın yaklaşım ise doğal veya sentetik materyallerden üç boyutlu poröz doku iskelelerinin oluşturulmasıdır (Esteban-Tejeda ve ark., 2016). Doku iskelelerinin etkinliğinin artırılabilmesi için farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Son yaklaşımlardan biri olan hücre ekilmiş doku iskelesi ile hasarlı bölgede lokal olarak uygun çevrenin oluşturulması sağlanabilmektedir. Güncel yaklaşımlardan bir diğeri ise hücrelerin çoğalma ve farklılaşma kapasitelerini artıran büyüme faktörlerini içeren sistemlerin geliştirilmesi ile hücre odaklı doku rejenerasyonunun hızlandırılmasının sağlanabilmesidir (Kim ve Tabata, 2015).

1.3.2. Rejenerasyon Tedavisinde Büyüme Faktörleri ve Antibiyotikler

1.3.2.1. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri, çok çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanan polipeptitlerdir ve göç, farklılaşma ve çoğalma gibi hücreyel aktiviteyi düzenleyen çözünür sinyal molekülleridir. Bazı büyüme faktörleri kan dolaşımına salgılanıp bu sayede hedef dokuya taşınabilmeleri sebebiyle hormonlara benzerler. Fakat hormonların üretimi glanduler dokularla sınırlı kalırken, büyüme faktörleri birçok farklı doku tarafından üretilir. Büyüme faktörleri, hedef hücrelerin yüzeyinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak, hücreyel eylemleri ortaya çıkarırlar ve rejeneratif işlemi uyarmak için biyolojik olaylar zincirini başlatabilirler (Britannica, 2019; Zhang ve Uludag, 2009).

Bir büyüme faktöründen ortaya çıkan nihai biyolojik cevap, büyüme faktörünün ve hedef hücrenin kimliğine, hücre numarasına, reseptör tipine ve diğer sinyal olaylarına bağlıdır. Bu nedenle, kontrollü salım sistemi tasarlamada kritik bileşen, maksimum doku tamiri için uygun tekli veya çoklu büyüme faktörü kombinasyonunun seçimidir (Vo ve ark., 2012).

Doku iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunda olumlu etkileri görülen büyüme faktörlerinin klinik kullanıma girmiş ve hala üzerinde çalışılan birçok çeşidi bulunmaktadır (Çizelge 1.1). Spesifik büyüme faktörleri doku oluşumu, olgunlaşması ve dokunun devamlılığında sorumlu proteinlerdir. Bu moleküller içinde, genel olarak BMP olarak bilinen, kemik morfogenetik proteinlerinin kuvvetli osteoindüktif etkileri vardır. Ayrıca birçok klinik ve deneysel çalışma sonucunda BMP'lerin güvenilir ve etkin olduğu kanıtlanmıştır. BMP-7 ve BMP-2 sırasıyla 2001 ve 2002 yıllarında klinik kullanım için Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA-Food and Drug Administration) onayı almıştır. BMP'lerin uzatılmış ve kontrollü salım sistemleri geliştirilmesi üzerine çalışmalar halen devam etmektedir. (Blackwood ve ark., 2012; Dimitriou ve ark., 2011; S. J. Sun ve ark., 2018).

Çizelge 1. 1. Büyüme faktörlerinin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaları (Vo ve ark., 2012)

Osteojenik faktörler	Anjiyogenik faktörler
TGF-β : Dönüştürücü büyüme faktörü	VEGF : Vasküler endotelial büyüme faktörü
GDFs : Büyüme farklılaşma faktörleri	FGF : Fibroblast büyüme faktörü
Aktivinler	PDGF : Platelet türevi büyüme faktörü
BMP : Kemik morfojenetik proteinler	IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü

Büyüme faktörlerinin güvenilirlikleri, etkinlikleri, yüksek maliyetleri ve pratik uygulamaları ile ilgili endişeler klinik kullanımlarını kısıtlamaktadır. Aynı zamanda beklenmeyen yan etkiler de klinik olarak gözlenmiştir (Kim ve Tabata, 2015). Büyüme faktörleri etki bölgesine doğrudan enjekte edildiklerinde büyüme faktörünün hasarlı bölgeden hızla difüze edilmesi sebebiyle etkisiz kalabilme olasılığı bulunmaktadır. Ayrıca kısa yarı ömür, biyolojik aktivitesinin sabit kalamaması, doku penetrasyonunun göz ardı edilecek kadar düşük olması da etkinliğin düşük olma sebeplerindendir (Jayaraman ve ark., 2015). Genellikle büyüme faktörlerinin etkinliğini artırmak için kullanılan yüksek dozlar sonucunda inflamasyon, tümör oluşumu (neoplazi) ve ektopik (istenen bölge dışında) kemik oluşumu gibi yan etkiler gözlenmektedir. Büyüme faktörü hedef bölgede görevini yapamıyorsa kemik iyileşmesi olmadan diğer dokularda problem oluşumu gözlenebilmektedir. Büyüme faktörleri vücuda enjekte edildiğinde veya etki bölgesine uygulandığında çözünür olan faktörler sadece hedef dokuda değil farklı dokularda da etki gösterir. Tüm bu olumsuz durumların önüne geçebilmek için biyomateryaller ile biyolojik aktif olan bu moleküllerden oluşan kontrollü salım sistemlerinin oluşturulması en umut verici yaklaşımdır (Del Castillo-Santaella ve ark., 2019; Gibbs ve ark., 2016; Hassani Besheli ve ark., 2018; Kang ve ark., 2019; Kim ve Tabata, 2015; Nguyen ve ark., 2017; Wang ve ark., 2018).

Büyüme faktörleri rejenerasyon tedavisinde oldukça etkin olsa da kontrol edilemeyen doku cevabı tedavide önemli bir engeldir. En ideal çözüm oluşan enflamasyonun tamamen çözülmesidir. Eğer kontrol sağlanamazsa akut enflamasyon sonucu doku hasarı, kronik enflamasyon ve fibrozis meydana gelebilmektedir. Özellikle sert dokudaki kontrol edilemeyen enflamatuvar cevap, nötrofil (polimorfonükleer lökosit: PMN) aracılı doku hasarı sonucu geri dönüşümsüz kemik kayıplarına sebep olabilmektedir. PMN mikrobiyal ortam oluşumunu engellemek için gerekli olmasına rağmen kronik PMN aktivasyonu organ fonksiyonunu bozan zehirli

maddelerin üretilmesine sebep olabilir. Periodontitis gibi kronik osteolitik enflamasyonlu hastalıklarda sürekli mikrobiyal ortam ve endojen çözünürlük yollarındaki tek bir sorun sonucu doku harabiyeti meydana gelebilir. Kısaca enflamasyonu çözmek veya oluşumunu engellemek doku kaybının önlenmesi ve doku rejenerasyonunun hızlandırılması açısından etkili bir işlemdir (Van Dyke ve ark., 2015).

Son zamanlarda bazı büyüme faktörleri ve etken maddeler ile kombine ilaç tedavisinin kemik oluşumunu desteklemesi araştırma konusu olmuştur. Bu kapsamda iki farklı büyüme faktörü, büyüme faktörü ile birlikte bir etken madde veya bir hücre destekleyici molekül (stroma hücre türevi faktör (SDF-1)) kombine edilebilmektedir. Özellikle enflamasyon öncesi sitokinlerin (interlökin-1 β) ve tümör nekroz faktörün (TNF- α) osteojenik farklılaşmayı inhibe etmesi nedeniyle, kemik rejenerasyonunda büyüme faktörlerinin antienflamatuar etken maddelerle kombine halde kullanılması dikkat çekmektedir. Çoklu etken madde (ornidazol, metronidazol, ketoprofen, doksisisiklin, gentamisin, simvastatin) salım sistemleri ile enfeksiyonun eliminasyonu, enflamasyonun inhibe edilmesi, doku yıkımının önlenmesi sonucunda kemik rejenerasyonunun sağlanması da farklı bir yaklaşım olarak araştırılmıştır (Dwivedi ve ark., 2018; Ho ve ark.; Kim ve Tabata, 2015; Wu ve Chang, 2014; Zang ve ark., 2019). Ancak henüz bu kombinasyonları birarada içeren bir ilaç şekli klinik kullanımda yer almamaktadır.

1.3.2.2. Antibiyotikler

Ağız boşluğu *Streptococcus*'un birçok türünü de içine alan 500'den fazla bakteri türüne ev sahipliği yapmaktadır. Bu bakteriler genel olarak herhangi bir soruna sebep olmasa da travma veya onarıcı cerrahi bakteriyel dengeyi patojenik bakterilerin lehine çevirebilmekte veya bakterilerin daha önce aseptik olan ortama geçmesine sebep olabilmektedir (Smith ve ark., 2019).

Kemik rejenerasyon tedavisi sırasında enfeksiyon riski en büyük endişelerden biridir çünkü kemik defektlerini enfeksiyon varlığında tedavi etmek oldukça güçtür. Tedavide kemik rejenerasyonu ve enfeksiyon kontrolü gibi ikili fonksiyona sahip bir materyalin kullanılması, bu soruna yeni bir terapötik yaklaşımdır (S. Zhang ve ark., 2016). Antibiyotiklerin profilaktik amaçla lokal veya sistemik olarak kullanılması komplikasyon riskini önemli ölçüde düşürmektedir. Gentamisin yüklü poli metil metakrilat (PMMA) kemik çimentosunun da özellikle protez eklem cerrahisinde altın standart olma sebebi budur (Teller ve ark., 2007). Gentamisin veya tobramisin (% 2-4 a/a) içeren PMMA ticari olarak temin edilebilmektedir ve klinikte rutin kullanımdadır (Perni ve ark., 2019).

Doku mühendisliğinde antibiyotiğin lokal kullanılması çok dikkat çeken bir yoldur. Kemik büyümesini teşvik etmek için biyoaktif moleküllerle tasarlanmış bir iskele ile aynı anda lokal olarak antibiyotik verilebilir ve böylece antibiyotiğin sistemik etkilerinin bir kısmı hafifletebilir. Özellikle periodontal rejenerasyon tedavisinde klinik olarak kullanılan, tetrasiklin, metronidazol ve doksisisiklin gibi antibiyotikleri içeren jel, çip, fiber gibi salım sistemleri bulunmaktadır (Smith ve ark., 2019).

Antibiyotiklerin doğrudan kemik çimentosuna eklenmesi lokal tedavi için basit ve klinik olarak uygun bir yöntem olsa da, bu yaklaşımın önemli iki sakıncası vardır. Bunlardan ilki, çimento uygulamasının ilk haftasında antibiyotik salımının tamamlanması, daha sonra implantın bakteriyel kolonileşmeyle karşı karşıya kalmasıdır. İkincisi ise, birçok antibiyotiğin yüksek derişimlerde osteoblastlara doğrudan toksik olmasıdır. Bu nedenle antibiyotiğin ilk çıkış etkisi lokal toksisite meydana getirebilir ve rejenerasyonu engelleyebilir. Bu sorunların giderilmesi için de tedavide antibiyotik salımı modifiye edilmelidir (Passos ve ark., 2019; Shah ve ark., 2016).

1.3.2.3. Büyüme Faktörü ve/veya Antibiyotik İçeren Rejeneratif Kontrollü Salım Sistemleri ve Üretim Yöntemleri

Periodontal rejenerasyon tedavisinde pro-osteojenik mediatörlerin ve antibiyotiklerin gelişmiş salım sistemleri aracılığıyla hasarlı dokuya uygulanması modern bir tedavi stratejisi olarak önerilmiştir. Bazı durumlarda, mikro ve nano taşıyıcılar greft veya doku iskelesi gibi hareket edebilmekte ve aynı zamanda biyoaktif molekülleri taşıyabilmektedir (Cafferata ve ark., 2018; Montero-Miralles ve ark., 2018).

Özellikle alveolar kemik rejenerasyonu için uygulanacak greft materyali defektin şekline, boyutuna, cerrahın uygulama şekline göre farklı formlarda şekillendirilebilir olmalı ve rejenere olan dokuya destek olabilen bir iskele görevi görebilmelidir. Ayrıca boşluğu doldurabilmeli, hücre, trombosit ve damarlanmayı teşvik edebilmeli ve yeni kemiğin oluşma süresi ile orantılı olarak parçalanabilmelidir (Iviglia ve ark., 2019).

Büyüme faktörleri ile lokal kontrollü salım sistemleri oluşturabilmek için kullanılacak en uygun taşıyıcı sistemler doku iyileşmesi için uygun protein derişimi sağlanana kadar birkaç hafta veya ayda metabolik olarak degrade olabilmelidir (Şekil 1.4). Yüksek yüzey alanı/hacim oranı, poröz yapı da bu sistemlerden beklenen özellikler arasındadır. Ayrıca büyüme faktörünün salım kinetikleri taşıyıcıya bağlı olduğu için protein, taşıyıcı materyal ve lokal çevre arasındaki ilişki de oldukça önemlidir. Örneğin BMP-2 kemik rejenerasyonu amacı ile bir taşıyıcı sisteme yüklenmişse taşıyıcı en az 3 hafta boyunca kontrollü salım sağlayabilmelidir (De Witte ve ark., 2018; Vo ve ark., 2012). Antibiyotikler ile oluşturulan lokal kontrollü salım sistemleri de antibiyotiğin hedef dokuda yeterli süre kalmasını sağlayabilmeli, patojenlerin antibiyotiğe karşı direncini engelleyebilmek için etken madde patojen etkileşimini artırabilmelidir (Gao ve ark., 2018).

Birleşme stratejisi	Şematik gösterim	Salım profili	(+) Avantaj ve (-) Dezavantajlar
Kovalent bağlanma			+ Doku iskelesi dışına büyüme faktörü kaçıışı yok - Büyüme faktörü biyoaktivite kaybı
Fiziksel bağlanma/ Adsorpsiyon			+ Büyüme faktörü biyoaktivite kaybı yok - Difüzyon ve degradasyon kontrollü salım - Hızlı ilk çıkış etkisi - Salım hızını kontrol etme güçlüğü
Nanopartikül/ Mikropartikül ile birleşme			+ Salım hızını kontrol edebilme + Birden fazla etken maddenin salımının sağlanabilmesi - Fazladan üretim basamakları - Üretimde organik solvan kullanılması

— = Kovalent bağ • = Büyüme faktörü ● = Mikro/Nanokapsül

Şekil 1. 4. Büyüme faktörünün taşıyıcı sisteme yükleme stratejileri ve bu sistemlerin kıyaslanmaları (De Witte ve ark., 2018)

Biyobozunur ve biyouyumlu doku iskeleleri, mikro ve nano seviyedeki ekstraselüler matrisi taklit ederek hücrelerin büyüebileceği geçici desteği sağlamaktadır. Bu nedenle de doku rejenerasyonunda oldukça önemlidir. Doku iskeleleri, sentetik veya doğal polimerlerin farklı teknikler kullanılarak poröz yapıda katılaştırılması ile elde edilmektedir. Üretim yöntemleri köpürtme, faz ayrışması, elektrodondürme, seçici lazer katılaştırma, eriyik kalıplama, membran laminasyon, dondurarak kurutma, üç boyutlu (3D) baskı, süperkritik akışkanlar olarak sıralanabilir. Özellikle bilgisayar destekli doku mühendisliği ile birlikte 3D baskı, hastalara özgü doku iskelelerinin imalatında yaygın olarak araştırılan bir üretim yöntemidir. Bunların yanı sıra partiküler sistemlerle kombine edilen katı iskeleler de güncel araştırma konuları arasındadır (Iviglia ve ark., 2019; Sahai ve ark., 2018).

Bunların haricinde biyoaktif cam olarak bilinen silika iskelelerin porözitesini artırılmış formu olan mezoporöz biyoaktif cam ilk kez 2004 yılında Yan ve ark.

tarafından elde edilmiştir (Yan ve ark., 2004). Bu materyal CaO-SiO₂-P₂O₅ bileşiminde olup yüksek oranda küçük por çaplı kanallardan oluşmaktadır. Biyokatif camın yüksek por hacmi ile yüzey alanı artmış ve bu sayede vücut sıvılarıyla *in vitro* apatit mineralizasyon kabiliyeti artırılmıştır (Gu ve ark., 2013).

Lin ve ark. (2010) yaptığı çalışmada BMP-2'den sentezledikleri P24 proteinini poli-laktik-ko-glikolik asit - polietilen glikol - aspartik asit (PLGA-(PEG-Aspartik asit)) kompleksi ile ürettikleri membran ve iskelelere adsorbe ettirmişlerdir. Bunun için de P24 terminal karboksil grupları NHS ile aktive edilmiş ve böylece PLGA-(PEG-Aspartik asit)_n kompleksinin amino grupları ile 24 saat boyunca tepkime vermiştir. Çalışma ile elde edilen verilere göre P24'ün % 85'i iskeleye kovalent olarak bağlanmıştır. Çalışmada değerlendirilmiş NHS ile muamele edilmiş ve edilmemiş iki ayrı sistemin *in vitro* çözünme hızı profiline göre de sisteme kovalent bağlı P24, sadece fiziksel olarak adsorbe edilmiş P24'e göre daha yavaş *in vitro* salım profili göstermiştir (Lin ve ark., 2010).

Büyüme faktörlerinin poröz katı iskeleler içine hapsedilmesi süperkritik sıvı ekstraksiyonu (SCF) işlemi ile de gerçekleştirilebilmektedir. Organik çözücü kullanımı ile protein denatürasyonu gerçekleştiği için yapı oluşturulduktan sonra protein aktivitesinde azalma meydana gelebilmektedir. Bu nedenle proteine zarar verebilecek bir sıvının kullanılmadığı SCF yönteminin proteinik maddelerin kontrollü salım sistemleri oluşturulmasında daha uygun olduğu literatürlerde belirtilmiştir. SCF işleminde çözücü olarak yüksek basınçla sıvı hale getirilmiş süperkritik CO₂ kullanılmaktadır. Bu işlemde basınç odası içindeki toz haldeki polimerle karıştırılan büyüme faktörü üzerine kullanılacak maddeye göre gerekli süperkritik sıvı ortamı oluşturulup (CO₂ için bu değerler 31 °C, 73,8 bar), işlem süresi sonuna doğru basınç düşürülerek, çözücü olarak kullanılan CO₂'nin tekrar gaz hale dönmesi sağlanmaktadır. CO₂ polimerik yapıdan ayrılırken, köpük yapısını meydana getirerek iskelenin katılaşmasını sağlamaktadır (Blackwood ve ark., 2012).

Bir grup araştırmacı poli-DL-laktik asit (PLA) granül tozu ve rhBMP-2 kullanarak süperkritik sıvı ekstraksiyonu ile köpük implantlar elde etmişlerdir.

rhBMP-2 sulu çözeltisi ile toz haldeki polimeri (800-1600 mg rhBMP-2 / 1 g polimer olacak şekilde) karıştırmış ve liyofilize etmişlerdir. 0,06 g bu üründen alınıp kalıpların içerisinde 100 bar CO₂ ile muamele etmişlerdir. 37 °C'de 20 dakika bekletildikten sonra PLA katı köpük haline gelmiştir. Deney sonunda da ELISA kit kullanarak, yapılan *in vitro* çözünme hızı çalışmaları sonucunda salımın 24 güne kadar uzadığını gözlemlemişlerdir (Gruber ve ark., 2009; Schliephake ve ark., 2008).

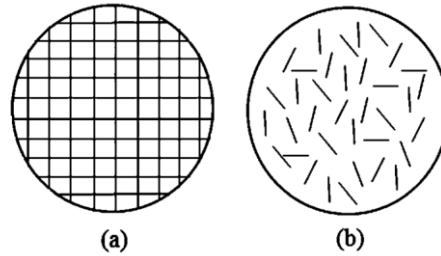
Visscher ve ark. (2018) sefazolin yüklü polikaprolakton (PCL) doku iskelelerini üç boyutlu yazıcı kullanarak üretmişlerdir. Bunun için polimerik iskeleyi ürettikten sonra etken maddeyi damlatma kurutma yöntemi ile sisteme yüklemişlerdir. Sistemin poröz yapısı sayesinde salım kontrol edilebilmiş ve etken maddenin sulu çözeltideki degradasyonu büyük ölçüde azaltılabilmektedir (Visscher ve ark., 2018).

Katı iskeleler ile ilgili en büyük sorun iskelenin bastırma ile şekillenmemesi ve cerrahların genel olarak kusurlu bölgeyi tamamen doldurmak için gözenekli fakat uygulama esnasında daha rahat şekil alan, bastırılabilir, uygulama bölgesini kolaylıkla doldurabilen materyalleri tercih etmeleridir. Bu sebeple periodontal rejenerasyon alanındaki çalışmalar son zamanlarda daha çok fibröz yapılar, jeller, filmler ve partiküler sistemler üzerine odaklanmıştır (Iviglia ve ark., 2019).

Fibröz iskele oluşturma yöntemi, elektrodöndürme yöntemi kullanılarak nano boyutta iplikler elde etme esasına dayanmaktadır. Özellikle yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda kullanılan membranların üretimi için bu yöntem oldukça uygundur. Elektrospın yöntemi ile doğal ve sentetik polimerlerle kalınlığı birkaç nanometreden mikrometreye kadar ayarlanabilen iplikler üretmek mümkündür.

Qasim ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada kitozan ile elde ettikleri nanofiberlerle periodontal rejenerasyon sağlayabilmeyi hedeflemişlerdir. Elektrospın yöntemi ile ekstraselüler matrisi taklit edebilen bir doku iskelesi üretildiği ve hücre kültürü deneyi sonucunda da hücre çoğalabilirliğinin membranla desteklendiği ifade edilmiştir (Qasim ve ark., 2017).

Başka bir çalışmada da elektrospin yönteminden farklı olarak, farklı sütün lifleri ile kitozan-aljinat filmlerin kombinasyonundan oluşan kompozit membranların elde edilmesi ile yara örtülerinin sağlamlştırılabileceği düşünölmüştür. Çalışmada lifler membrana sıralı bir şekilde ve rastgele yerleştirilmiş ve mekanik özellikleri incelenmiştir (Şekil 1.5). Ayrıca bu çalışmada bu kompozit membranlara epidermal büyüme faktörü ilavesi ile rejenerasyonun hızlandırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın sonucunda da araştırmacılar, düzgün yerleştirilmiş liflerin kopma uzamasını arttırdığını ve yapılan hücre kültürü deneyiyle kitozan-aljinat biyomateryallerinin hücre oluşumunu desteklediğini ve epidermal büyüme faktörü eklenmesinin önemli katkı sağladığını tespit etmişlerdir (Bierhalz ve Moraes, 2017).



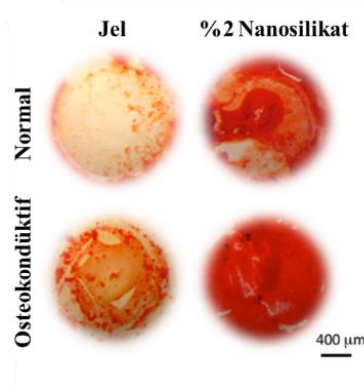
Şekil 1. 5. Sütün liflerinin matris içerisinde düzgün yerleştirilmesi (a) ve rastgele dağıtılmasının (b) şematik gösterilişi (Bierhalz ve Moraes, 2017)

Başka bir çalışmada da rejeneratif endodonti tedavisi için klindamisin, metronidazol ve siprofloksazini bir arada içeren polidioksanon nanolifler üretilmiştir. Lifler elektrodöndürme yöntemi ile elde edilmiş ve etkinliği *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda üretilmiş nanolifler ile kontrol gruplarına göre farklı türlerdeki bakterilerin çoğalmasının baskılanabildiği, dentinde üç hafta sonunda bile renklenmenin meydana gelmediği, liflerin düşük sitotoksositeye sahip olduğu ve potansiyel anjiyogenik etkisinin olduğu belirtilmiştir (Karczewski ve ark., 2018).

Çapraz bağlı polimer ağlarından oluşan hidrojeller ise yüksek su içeriği olan, ancak polimer zincirleri arasında oluşan kimyasal ve fiziksel bağlar nedeniyle hemen çözünmeyen, suyun bu bağların arasına girmesiyle kolayca şişebilen, biyoyumlu, kolay ayarlanabilir mekanik özellikleri olan ve biyolojik dokuyu taklit edebilen ilaç

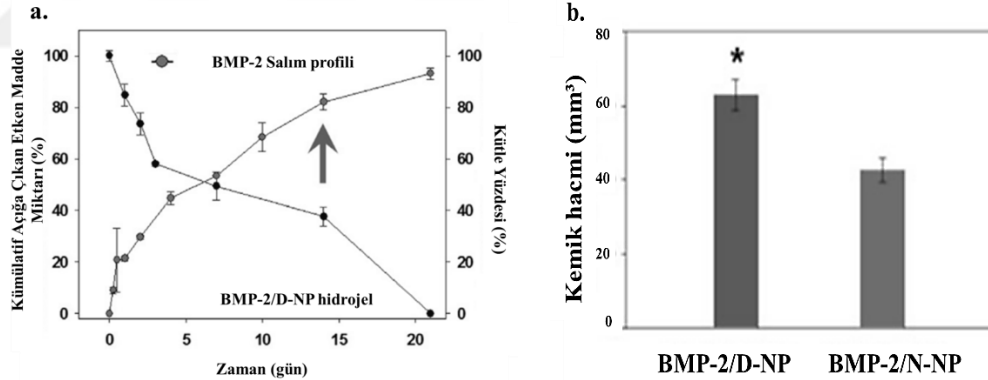
taşıyıcı sistemlerdir. Yüksek poroziteleri sayesinde hücrelerin çoğalması için geçici destek sağlayabilen hidrojeller, doku mühendisliği için umut vaat eden sistemler arasında yer almaktadır. Özellikle doku rejenerasyonunda tamamen şiştiğinde aldıkları üç boyutlu yapıları sayesinde biyolojik aktivite üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Ayrıca yüzey özellikleri hücrelerin adezyonu, çoğalması ve göçünü oldukça etkilemektedir (Bhattarai ve ark., 2010; Zhuang ve ark., 2016). Tüm bunların yanı sıra hidrojellere grafen, grafen oksit, karbon nanotüp, hidroksiapatit, biyoaktif cam gibi materyallerin eklenmesi ile hidrojellerin mekanik ve biyolojik özellikleri iyileştirilebilmektedir (Xavier ve ark., 2015).

Xavier ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada jelatin ve metakrilatı çapraz bağlayarak hidrojel oluşturmuşlardır. Daha sonra foto-başlatıcı çözeltisi içinde nanosilikat partikülleri disperse etmiş ve bu karışıma önceden hazırlanmış olan hidrojel ilave ederek UV ışığına maruz bırakmışlardır. Bu sayede nanopartiküller ve hidrojel çapraz bağlanmış ve nanokompozit hidrojeller oluşturulmuştur. Bu çalışmada nanokompozitlerin kemik morfogenetik proteinin aktivitesi olan osteojenik farklılaşmayı sağlaması sebebiyle ortama eklendiği belirtilmiştir. Çalışmada geç evre osteojenik farklılaşma özelliği olan kemik benzeri inorganik kalsiyum birikintilerinin üretimini, Alizarin Red S boyaması ile belirlemişlerdir. Hem sadece hidrojel hem de nanokompozit hidrojel ile kırmızı lekelenme görülmüş, fakat nanokompozitlerde belirgin bir artış görüldüğü belirtilmiştir (Şekil 1.6) (Xavier ve ark., 2015).



Şekil 1. 6. Preosteoblast hücreleri tarafından normal ve osteokondüktif ortamda biriken inorganik kalsiyumun 14. günde optik görüntüleri (Xavier ve ark., 2015)

Başka bir çalışmada ise ısıya duyarlı hidrojel sistemlerinin klinik olarak birçok avantajı olduğu ve ayrıca lokal kemik rejenerasyonu için uygun ortamı sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca sistemin yüksek su içeriği sebebiyle kemik morfogenetik proteinin kolayca yüklenebildiğine değinilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada ısıya duyarlı polifosfazene hidrofobik ve iyonik etkileşimli yapılar bağlayarak BMP-2 salımının kontrol edilebileceğini göstermişlerdir. Hidrofilik yapı olarak naopartiküllere polietilen glikol eklenmiştir (BMP-2/N-NP). BMP-2 ile etkileşimi artırabilmek için de diğer bir grup formülasyona karboksilik asit yapısı bağlanmıştır (BMP-2/D-NP). Naopartiküllerin süspande edildiği ortamın sıcaklığının oda sıcaklığından vücut sıcaklığına artması ile hidrojel oluşumu gözlenmiş ve ortam viskozitesi artmıştır. Yapılan *in vitro* salım çalışmalarında da hidrojel kütlesi zamana bağlı olarak azalırken açığa çıkan BMP-2 miktarı artmıştır. Araştırmacılar salımın kontrollü olarak 20 günde tamamlandığını göstermiş ve *in vivo* deneylerde de BMP-2/D-NP hidrojellerin BMP-2/N-NP hidrojellere göre daha etkili bir şekilde kemik hacmini artırdığını belirtmişlerdir (Şekil 1.7) (Seo ve ark., 2015).



Şekil 1. 7. BMP-2/D-NP hidrojelden BMP-2 salım profili (a) ve *in vivo* deney sonucu elde edilmiş kemik hacimleri (b) (Seo ve ark., 2015)

Bunların haricinde polivinil alkol (PVA) ile üretilen hidrojeller, yapı, mekanik özellikler, akışkanlık gibi benzerlikleri nedeni ile kırık ile ilgili çalışmalarda sıkça kullanılmıştır. Fakat PVA hidrojel ekstraselüler matrise kıyasla tek başına hücre adezyonu ve büyümesini destekleyemediği için doku iskelesi olarak kullanılmak amacıyla üretildiği çalışmalarda genellikle büyüme faktörleri bu taşıyıcı sisteme dahil edilmektedir (Nie ve ark., 2015). Fakat vücutta doğal olarak bulunan fibrinle

oluşturulan hidrojel içerisinde dağıtılmış kök hücreler ve BMP-2 yüklü heparin-poli-L-lizin nanopartiküller ile araştırmacılar 4 hafta sonunda ektopik kemik oluşumunun ortamda fibrinin olmasından açıkça etkilendiğini belirtmişlerdir (Park ve ark., 2009).

Farklı tedavi amaçları ile lokal kullanım için üzerinde çalışılmış birçok antibiyotik yüklü hidrojel çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmalarda siprofloksazin, gentamisin, vankomisin, ampisilin, sefazolin, levofloksazin, linkomisin kullanılmıştır. Antibiyotikler için üzerinde çalışılmış hidrojel formülasyonlarının çoğu göz, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları için çalışılmıştır (Li ve ark., 2018).

Chotitumnaee ve ark. (2019) dental uygulamalar için siprofloksazin hidroklorid yüklü fibrin hidrojel geliştirmişlerdir. Fibrin hidrojel çalışmalarının kemik enfeksiyonları, periodontitis, diş pulpası hastalıkları ve pulpa rejenerasyonu üzerine olduğunu belirten araştırmacılar yaptıkları çalışmada pulpa rejenerasyonunu etkin şekilde gerçekleştirebilmeyi amaçlamıştır. Çalışmada % 0,4 fibrin hidrojel, fibrinojen, trombin ve kalsiyum iyon çözeltisinin tris tampon çözeltisi içerisinde karıştırılması ile elde edilmiştir. Siprofloksazin, hidrojel hazırlanırken trombin çözeltisi içerisinde ilave edilmiştir. Formülasyon kalıplara alınmış ve 30 dakika boyunca jelasyonun tamamlanması için beklenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre *in vitro* bakteristatik aktivite için 1-2 µg/mL bakterisit aktivite için 4-15 µg/mL siprofloksazinin yeterli olduğu bulunmuş, bunun da daha önceki çalışmalarda elde edilmiş ortalama minimal inhibisyon derişiminden iki kat daha düşük dozda olduğu belirtilmiştir. Çalışmada kontrol olarak kullanılan aljinat hidrojeline göre *in vitro* salım profilinde ilk çıkış etkisinin azaltılabildiği gösterilmiştir (Chotitumnaee ve ark., 2019).

Çalışmamızda kullanılmış olan film, partikül ve kombine kontrollü salım sistemleri ayrı başlıklar altında incelenmiştir.

1.3.2.3.1. Filmler

Jeller, enjeksiyonluk sistemler, filmler, fiberler, partiküler sistemler veya *in situ* implantlar gibi kontrollü ilaç salımı sağlayan çeşitli formülasyonlar arasında, ilaç yüklü filmler esnek, kolay ambalajlanabilir, kolay uygulanabilir oldukları için lokal ilaç salım sistemleri için oldukça uygundur (Madhumathi ve ark., 2018). Özellikle son zamanlarda periodontitis tedavisinde kullanılmak üzere anti inflamatuvar (Khajuria ve ark., 2018), antibiyotik (Kilicarslan ve ark., 2018; Madhumathi ve ark., 2018) yüklü film çalışmaları oldukça dikkat çekmektedir.

Filmler, etken maddelerin polimer içerisinde dağıtıldığı veya çözündürüldüğü, salımın difüzyon, polimerin çözünmesi veya matrisin erozyonu ile meydana geldiği ilaç salım sistemleridir. Bu dozaj formu, özellikle periodontal cep içi kullanım için fiziksel özellikler bakımından birçok avantaja sahiptir (Kilicarslan ve ark., 2018; Sah ve ark., 2019). Filmler, etken madde taşıyıcılığının yanı sıra, matris yapısı sayesinde üzerinde hücre çoğalmasına olanak sağlamakta ve bu sayede doku rejenerasyonunun gerçekleştiği bir iskele görevi görebilmektedir (Patra ve ark., 2016).

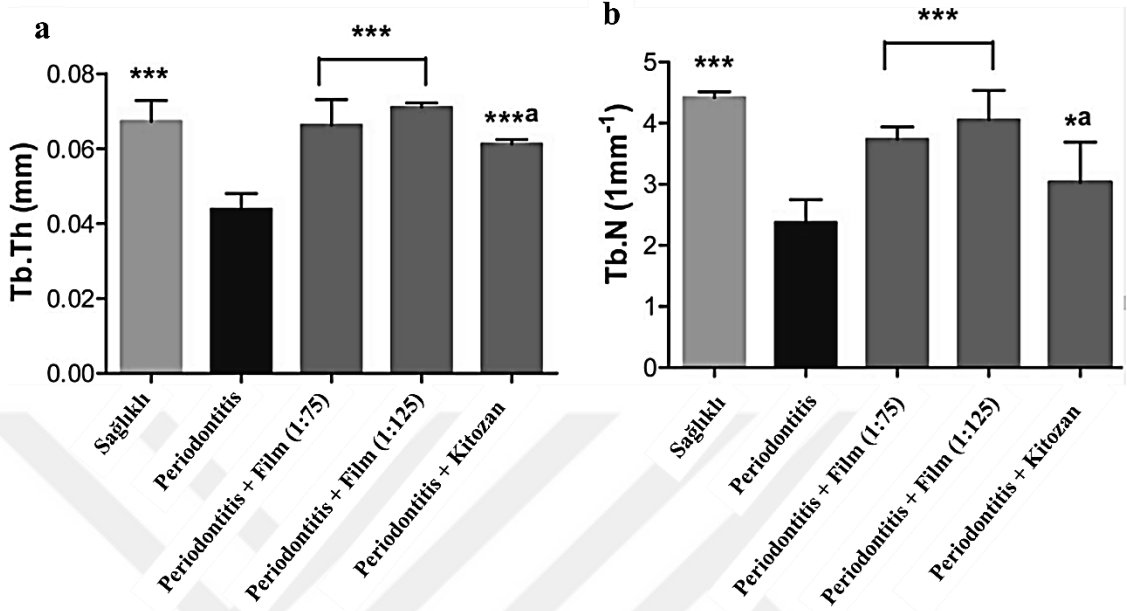
Filmlerin üretiminde genel olarak kitozan (Arzate-Vazquez ve ark., 2012; Kalaycioglu ve ark., 2017; Kilicarslan ve ark., 2015a; Kilicarslan ve ark., 2015b), aljinat (Crossingham ve ark., 2014; Shankar ve ark., 2016), jelatin (Dolci ve ark., 2018), selüloz türevleri (Kilicarslan ve Gorgoz, 2012) gibi doğal polimerler, bu polimerlerin bir veya birkaçının kombinasyonu ile (Bao ve ark., 2018; Kilicarslan ve ark., 2018; Kumria ve ark., 2018; Madhumathi ve ark., 2018) veya PLGA, PEG, Eudragit, polimetil-vinil eter-ko-maleik asit gibi sentetik polimerlerle kombinasyonları (Demir ve ark., 2017; Lai ve ark., 2018; Perugini ve ark., 2003) sıklıkla çalışılmaktadır. Ayrıca yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda kullanılan membranlar da yine sentetik, özellikle politetrafloroetilen (PTFE), ve doğal (kitozan, aljinat, kolojen, trombosit konsantrisine dayalı membranlar) polimerik materyallerden elde edilmektedir. Özellikle konsantre trombosit membranlar doğal olarak yapısında büyüme faktörlerini bulundurduğu için periodontal rejenerasyonda yeni kemik oluşumunda oldukça etkilidir (Babo ve ark., 2014).

Filmler için geliştirilmiş farklı üretim yöntemleri olsa da, kolay uygulanabilirliği, ek bir ekipmana gerek olmaması gibi sebeplerle en sık kullanılan dökme-çözücü buharlaştırma yöntemidir (Karki ve ark., 2016). Bu yöntem, hazırlanan polimer çözeltisinin uygun kaplara aktarılması, ve çözücünün tamamen uzaklaşması ile filmin elde edilmesi esasına dayanmaktadır.

Ramineni ve ark. (2015) polivinilprolidon ve karboksimetil selüloz karışımından oluşan polimerik çözeltiliye epidermal büyüme faktörü (EGF) çözeltisi (% 0,1 BSA çözeltisi içinde) ekleyip homojenize ettikten sonra teflon kalıplarda çözücüyü uzaklaştırarak filmler elde etmişlerdir. Araştırmacılar, *in vitro* salım deneyleri sonucunda EGF'nin %58'inin ilk 6 saatte açığa çıktığını fakat sonraki 18 saat boyunca salımın yavaşladığını ve 24 saatte %88'inin açığa çıktığını belirtmişlerdir (Ramineni ve ark., 2015).

Khajuria ve ark. (2018) periodontitisi tedavi etmek ve alveolar kemik kaybını engelleyebilmek için kitozan filmler üretmişlerdir. Aslında bir antidiabetik olan metforminin *in vitro* osteoblast hücrelerinin oluşumunu desteklediği, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkinliği farklı çalışmalarda kanıtlandığı için araştırmacılar hazırladıkları filmlere metformin yüklemişlerdir. Bu amaçla % 2 asetik asit içerisinde kitozani çözmüş, içerisine plastizer olarak % 0,5 (h/h) gliserin ilave etmişlerdir. Cam petri kaplarına aktarılarak kurutulmuş olan kitozan filmler glutaraldehit çözeltisine daldırılarak 15 dakika bekletilmiş ve çapraz bağlanması sağlanmıştır. Etken madde:polimer oranı 1:75 ve 1:125 olarak çalışılmıştır. Çalışmada formülasyonların özelliklerinin incelenmesi için kalınlık ve ağırlık analizleri, işlem etkinliği, adezyon testleri, taramalı elektron mikroskopisi analizleri, *in vitro* etken madde salım çalışmaları, *in vitro* antibakteriyel aktivite testleri ve ayrıca *in vivo* etkinlik deneyleri gerçekleştirilmiştir. Salım profilleri incelendiğinde pH 6,6 McIlvaine tamponu içerisinde ilk bir saatte bir ilk çıkış etkisi gözlenirse de salım 11 saate kadar devam ettirilebilmiştir. İlk çıkışın da film yüzeyindeki etken maddeden kaynaklı olduğu belirtilmiştir. *In vitro* antibakteriyel etkinlik testleri sonucunda da salımın gerçekleştiği 11 gün için de *Porphyromonas gingivalis* bakterisi için inhibisyon zonu gözlemlendiği belirtilmiştir. *In vivo* deneyler sonucunda da elde edilen mikrobilgisayarlı tomografi

(mikro-BT) analizi sonuçlarına göre de tedavi grubunda kemik oluşumunun etkin şekilde artırılabilirdiği garfiklerle gösterilmiştir (Şekil 1.8) (Khajuria ve ark., 2018).



Şekil 1. 8. Mikro-BT analizi ile kemik dokusundaki (a) trabeküler kalınlık (Tb.Th) ve (b) trabeküler sayısının (Tb.N) değişimin grafik olarak gösterimi (Khajuria ve ark., 2018)

Filmlere diğer bir etken madde yükleme yöntemi ise tabaka tabaka polielektrolit film oluşturma yöntemidir. Bu yöntem ile iskele sırayla pozitif ve negatif yüklü moleküllerden oluşan sistem içine batırılarak çok tabakalı film oluşturulur. Büyüme faktörü de yüküne göre bu tabakalar arasında hapsedilebilir (Blackwood ve ark., 2012). Ayrıca W. Sun ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada olduğu gibi kitozan ve aljinat gibi farklı yüklü polimerlerin sırayla kalıplara dökülmesiyle çok tabakalı polielektrolit kompleks (PEC) oluşturulabilmektedir. W. Sun ve ark. (2018) sisteme bir büyüme faktörü eklememiştir, fakat çalışmadaki amaç yara tedavisi olduğu için sistemin porozitesinin doku rejenerasyonunu desteklemesinin öneminden bahsetmiş ayrıca kitozanın antimikrobiyal etkinliğinin oluşturulan sistem için öneminden bahsetmişlerdir. Şekil 1.9 ile verilen antimikrobiyal aktivite sonuçlarında da gösterilmiş olduğu gibi araştırmacılar 1-5 arası numaralandırılmış E. Coli ekilmiş petri kaplarında sırasıyla (aljinat (A), kitozan (C)), A, 2A1C, 3A2C, 4A3C ve 5A4C PEC filmleri yerleştirmiş ve en etkili antimikrobiyal aktivite en fazla katta kitozan filmi içeren formülasyonda gözlenmiştir (W. Sun ve ark., 2018).



Şekil 1. 9. PEC-filmlerin antimikrobiyal aktivitesi (W. Sun ve ark., 2018)

Kilicarslan ve ark. (2018) periodontitis tedavisinde kullanılmak üzere klindamisin fosfat yüklü PEC film hazırlamışlar ve *in vitro* özelliklerini incelemişlerdir. Sistemin üretiminde pozitif yüklü kitozan ve negatif yüklü aljinat kullanmışlardır. Çalışmada farklı molekül ağırlıktaki kitozan ve aljinatın % 1, % 2 ve % 3 derişimlerdeki çözeltileri farklı oranlarda prob sonikatör ve Ultraturax ile homojenize edilerek kompleksleşmenin oluşması sağlanmıştır. Hava kabarcıklarından arındırılmış jel daha sonra cam petri kaplarına aktarılarak çözücüsünün oda sıcaklığında uzaklaşması sağlanmıştır. Çalışmada klindamisin fosfatın *in vitro* salımı 10 saate kadar uzatılabilmektedir. Elde edilen filmlerin yüksek adeziv özellikleri sayesinde periodontal cep içerisinde kolaylıkla kalabileceği belirtilmiştir (Kilicarslan ve ark., 2018).

PEC filmler üzerinde yapılmış hücre adezyonu ve motilitesi ile ilgili bir çalışmada, polianyon bir polimer olan poli allilamin hidroklorürden sentezlenen iki kuvvetli polikasyon polimer ile PEC filmler üretilmiştir. İnsan deri fibroblastları filmler üzerine ekilmiş ve hücre çoğalması ve hareketi incelenmiştir. Çalışmada farklı tabaka sayısı ile sitofilik veya sitofobik membran üretmenin mümkün olduğu, çok katmanlı filmler ile elde edilmiş olumlu sonuçlardan yola çıkarak, bu değerlendirmelerin yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu için olumlu olduğu sonucuna varmışlardır (Wytrwal ve ark., 2016).

Tüm bu incelemeler sonucunda çalışmamızda dental uygulamalar açısından PEC filmlerin avantajlı olacağı düşünülerek kitozan ve aljinat ile polielektrolit kompleks filmler oluşturulmasına karar verilmiştir.

1.3.2.3.2. Partiküler Sistemler

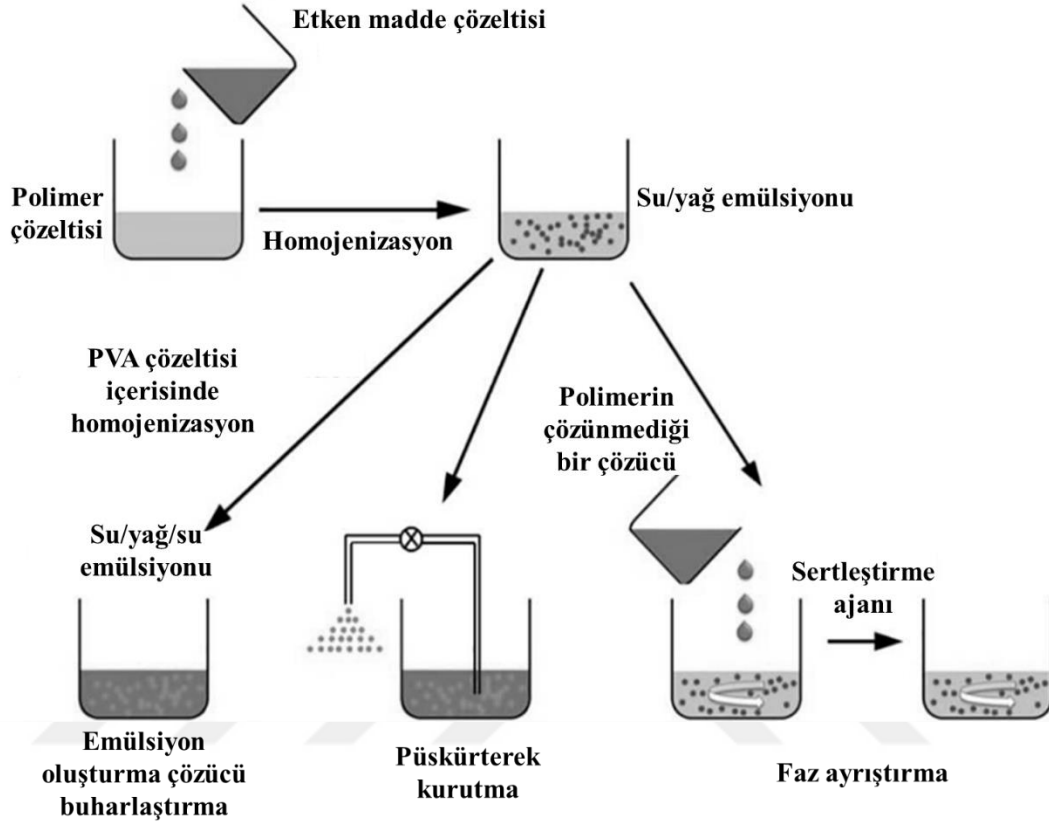
Nanoteknolojideki son gelişmeler, biyomedikal uygulamaların ve tedavinin optimize edilebilmesinin önünü açmıştır. Büyük yüzey alanları, çeşitli yapısal özellikleri, kan dolaşımında kalış sürelerinin uzun oluşu, çoğu hastalığın teşhis ve tedavisine göre yapılandırılabilir olmaları, çeşitli biyoaktif ajan ve organlara hedeflendirilebilir olmaları nedeniyle nanoterapötikler ilgi odağı olmuştur (Esim ve ark., 2019; Sanna ve ark., 2014). Lokal salım sistemleri tedavi edilecek bölgede uzun süre kalarak tedavi etkinliğini artırır, sistemik yan etkileri azaltır ve lokal uygulama ile sistemik uygulamaya göre kullanılan doz azalır (Gu ve ark., 2013).

Nanopartikül üretimi çözücü buharlaştırma, tuzla çöktürme, nano çöktürme, tek veya çoklu emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma, elektrosprey yöntemi, püskürterek kurutma/dondurma, sol-jel yöntemi, koaservasyon, süperkritik sıvı teknolojisi, iyonotropik jelasyon gibi yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemlerden bazılarının hazırlanma şekli Şekil 1.10 ile şematize edilmiştir. Bu teknikler arasından en çok kullanılan emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemidir. Bu yöntemde işlem basamakları;

1. Polimer çözeltisi ve etken madde çözeltilerinin homojenize edilmesi,
2. Mikro veya nano boyutlu damlacıkların oluşumu,
3. Çözücünün uzaklaştırılması işlemi sonrasında katı partiküllerin oluşturulması, ayrılması ve kurutulması olarak sıralanabilir.

Emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yönteminin en büyük dezavantajı protein yapılı etken maddelerin organik çözücü kullanımına bağlı olarak denatürasyona uğramasıdır. Ayrıca yükleme etkinliği, salım hızının istenildiği şekilde ayarlanamaması, hidrofilik etken maddelerin enkapsülasyonunun güçlüğü de bu yöntemde karşılaşılabilecek sıkıntılar arasında yer almaktadır. Fakat yöntemin kolay uygulanabilir olması, modifikasyonlara açık olması, yöntemde özel bir cihazın kullanımına gerek olmaması gibi avantajları sayesinde en sık kullanılan yöntemler

arasındadır (Bilensoy, 2014; Bozkir ve Devrim, 2014; Jayaraman ve ark., 2015; Ye ve Chi, 2018).



Şekil 1. 10. Bazı nano- ve mikroparikül hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi (Ding ve Zhu, 2018)

Partiküler sistemler için çeşitli çalışmalarda farklı polimerler kullanılmıştır. Bu polimerler içerisinde doğal olanlar kollajen, hyaluronik asit, nişasta, kitozan, dekstran vb. olarak sıralanabilir. Sentetik polimerler için de poli-(α -hidroksi asit), polianhidritler, poli(ϵ -kaprolakton), poloksamerler örnek olarak verilebilir (Shim ve ark., 2014; Street ve ark., 2002; Ueda ve ark., 2002; Vo ve ark., 2012).

Kemik rejenerasyonu için kullanılan sentetik polimerler mekanik ve degradasyon özelliklerinin değiştirilebilmesi, uygun hale getirilebilmesi gibi sebeplerle tercih edilmektedirler (Jayaraman ve ark., 2015). Özellikle PLGA gibi sentetik polimerlerle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Del Castillo-Santaella ve ark., 2019; S. J. Sun ve ark., 2018; Vo ve ark., 2012; F. Zhang ve ark., 2016; Zhang ve

ark., 2018; Zhuang ve ark., 2016). PLGA, FDA onaylı bir polimer olup zamanla biyolojik bozunabilme profili ve toksik olmayan degradasyon ürünleri sayesinde uzun zamandır biyomateryal olarak kullanılmaktadır (Blackwood ve ark., 2012; Topal ve ark., 2018).

Büyüme faktörlerini iskele içine doğrudan yüklemektense mikro/nanoküre haline getirmek ve bu taşıyıcı sistemleri iskele içine yerleştirmek salımı yavaşlatarak etkinliği artırmak için tercih edilmektedir. Büyüme faktörü yüklü mikroküre üretimi için genel olarak doğal polimerlerden jelatin, sentetik polimerlerden de 50:50 ko-monomer içeren PLGA tercih edilmiştir. PLGA, kolay mikro- ve nanoküre oluşumu, makul enkapsülasyon etkinliği ve salım karakteristikleri gibi sebeplerle yaygın olarak kullanılmaktadır (Blackwood ve ark., 2012; Devrim ve Bozkir, 2014).

Büyüme faktörünün mikroküre içine yüklenmesi genellikle işlem sırasında yapılmaktadır. Büyüme faktörünün sulu çözeltisi ve etil asetat veya diklorometan (DCM) içinde çözülmüş polimer karıştırılır ve su/yağ (s/y) emülsiyonu oluşur. Bu emülsiyon daha sonra sulu ortam içinde disperse edilerek ikinci emülsiyon (s/y/s) oluşur. Sulu ortam genel olarak damlacık yapısını muhafaza etmek amacıyla polivinil alkol (PVA) veya PEG gibi stabilizanları içermektedir. Sonrasında yapılan çözücü uzaklaştırma işlemi ile de damlacıklar katı partiküller haline döner. Elde edilen partiküller santrifüj veya filtrasyonla ayrıldıktan sonra liyofilize edilir. Bovin serum albumin (BSA) ve PEG kullanılarak organik çözücü ile büyüme faktörü etkileşimi ve protein denatürasyonu engellenebilir (Blackwood ve ark., 2012).

Ruhe ve ark. (2005) yaptığı bir çalışmada rhBMP-2 (rekombinant insan BMP-2) yüklemek için iki farklı molekül ağırlığındaki PLGA ile çoklu emülsiyon sistemi oluşturmuş ve daha sonra çözücü olarak kullanılan DCM uzaklaştırarak partiküller elde etmişlerdir. Bu çalışmada PVA stabilizan olarak kullanılmıştır. Bu partiküller 44-45µm boyutlarında elde edilmiştir. Daha sonra bu partiküllere PBS/BSA içerisinde çözülmüş haldeki iyotla işaretlenmiş 131I -rhBMP-2 adsorbe ettirilmiştir ve daha sonra elde edilen ıslanmış partiküller liyofilize edilmiştir (Ruhe ve ark., 2005).

Antibiyotiklerin uygulama bölgesindeki salımının kontrol edilmesini sağlamak için de güncel nanopartikül ve mikropartikül çalışmaları bulunmaktadır. Antibiyotiklerin de partiküler sistemlere yüklenmesinde çoğunlukla emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi tercih edilmektedir.

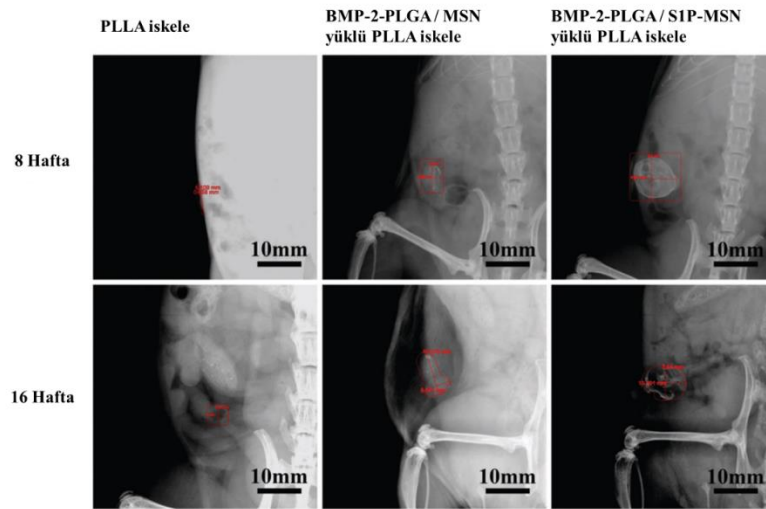
Alenezi ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada alveolar kemik kaybını önlemek için özellikle kemik enfeksiyonlarında etkin olan makrolid grubu antibiyotiklerden klaritromisin yüklü PLGA mikroküreler üretmişlerdir. Çalışmada tekli emülsiyon (y/s) oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmış ve özetle 10 mg klaritromisin ve 500 mg PLGA DCM içinde çözüldükten sonra % 0,25 (a/h) PVA içerisine damlatılmış ve 10000 rpm'de homojenize edilmiştir. Daha sonra DCM'yi uzaklaştırmak için manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, santrifüj ile partiküller ayrılıp yıkanmış ve tekrar santrifüjlenip liyofilize edilmiştir. Ortalama 26 µm boyutunda ve % 94 yükleme etkinliğine sahip partiküller elde eden araştırmacılar partiküllerle 4 hafta boyunca *in vitro* salım gözlemişlerdir. *In vivo* deneylerde kullanılan tavşanların kafataslarına beş milimetre çaplı defektler açılmış ve tavşanlar negatif kontrol, trikalsiyum fosfat, trikalsiyum fosfat ve klaritromisin ve trikalsiyum fosfat ve PLGA mikropartiküllerin uygulandığı dört gruba bölünmüştür. Deney grupları iki, dört ve 12. hafta sonunda sakrifiye edilmiş ve kemik dokuları alınmıştır. Sonuç olarak sakrifiye edilmiş dokuların mikro-BT analizi sonucunda 12 hafta sonrasında mikroküreler ile anlamlı derecede yüksek seviyede yeni kemik oluşumu gözlenmiştir (Alenezi ve ark., 2018).

1.3.2.2.3. Kombine Sistemler

Büyüme faktörünün salım sisteminden açığa çıkışının kontrollü olarak sağlanması etkinlik açısından çok önemli olsa da rejenerasyon tedavisi için tek önemli parametre değildir. Sinerjik etkili veya birbirinin etkinliğini tamamlayan farklı büyüme faktörlerinin bir arada kullanılması, doku rejenerasyonunu destekleyen farklı etken madde gruplarının tedaviye dahil edilmesi, uygulama bölgesinde meydana gelecek inflamasyonu veya mikrobiyal üremeyi engellemek için antiinflamatuvar veya antimikrobiyal maddelerin kullanılması, uygulanan sistemin dokuya uyumlu hale

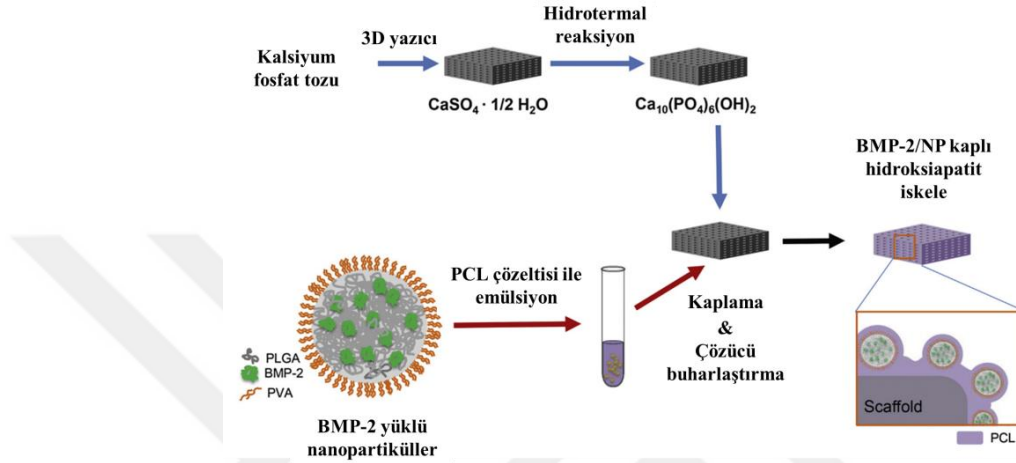
getirilmesi gibi önemli parametreler de göz önüne alındığında sistemlerin tek başlarına ortaya koydukları tedavi etkinliklerinin artırılabilceği yapılan çeşitli kombinasyon çalışmaları ile açıkça gösterilmektedir (Barati ve ark., 2016; Farokhi ve ark., 2016; Gilmore ve ark., 2016; Sahai ve ark., 2018).

Zhang ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada sfingozin-1-fosfatı (S1P), mezoporöz silika nanopartiküller (MSN) içine hapsederek anjiyogenik mikrosistemi ve BMP-2'yi PLGA mikropartiküller içine hapsederek osteojenik mikrosistemi oluşturmuşlardır. Bu mikropartiküllerden ilkinisi iskele üretimi sırasında ikincisini ise sonradan ekme yöntemi ile ısı güdümlü faz ayrışması yöntemi ile elde edilmiş poli-L-laktik asit (PLLA) doku iskelesine yüklemişlerdir. Fareler ile yaptıkları ektopik kemik oluşumu deneyinde deri altına PLLA iskele, BMP-2 yüklü mikropartikül ve etken madde içermeyen MSN yüklü iskele, BMP-2 yüklü mikropartikül ve S1P-MSN nanopartikül yüklü iskele yerleştirmişlerdir. Sekiz ve 16 hafta sonunda X-ray biyogörüntüleme sistemi ile elde ettikleri sonuçlar da etken maddelerin ve iskelenin kombine halde kullanılması ile kemik oluşumunun daha hızlı meydana geldiğini göstermiştir. Ayrıca 16 hafta sonunda tüm formülasyon grupları için yüksek düzeyde kemik rejenerasyonu gözlenirse de iki etken madde içeren iskelenin çevresinde geniş mineralizasyona sahip bir kemik kabuğunun oluştuğu ve ayrıca bir kemik iliği boşluğu oluşumunun gerçekleştiğini göstermişlerdir (Şekil 1.11) (Zhang ve ark., 2018).



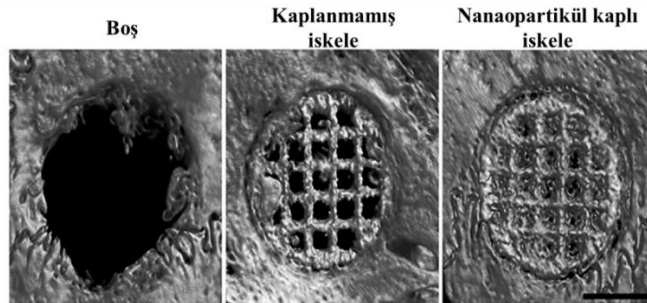
Şekil 1. 11. X-ray biyogörüntüleme sistemi ile elde edilmiş ektopik kemik oluşumu görüntüleri (Zhang ve ark., 2018)

Başka bir çalışmada yapılan üç boyutlu yazıcı ile hazırlanmış hidroksiapatit doku iskelesi ile BMP-2 yüklü PLGA nanopartiküller, polikaprolakton (PCL) kullanılarak birleştirilmiştir (Şekil 1.12). Nanopartiküllerin hidroksiapatit doku iskelesinin porlarına kadar nüfuz edebilmesi için bu işlemi vakum altında gerçekleştirmişlerdir (Kim ve ark., 2018).



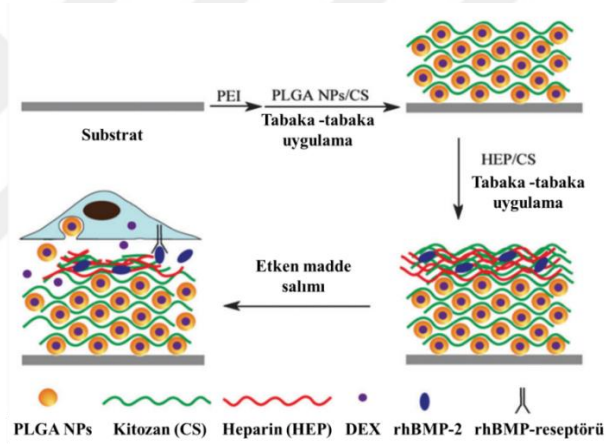
Şekil 1. 12. PCL ile nanopartiküllerin doku iskelesi ile birleştirilmesi (Kim ve ark., 2018)

Yine bu çalışmada tavşanlarda oluşturulan kalvarial defektlerin sekiz hafta sonunda mikrobilgisayarlı tomografi (Mikro-BT) ile elde edilen görüntüleri ve oluşan kemik hacmi ölçümleri sonucunda tek başına iskele ile oluşan kemik hacminin, nanopartikülle kaplı olana göre çok daha düşük olduğu sonucuna varmışlardır (Şekil 1.13) (Kim ve ark., 2018).



Şekil 1. 13. Hidroksiapatit iskelesinin implantasyon sonrasındaki 8. hafta mikro-BT görüntüleri (Kim ve ark., 2018)

Qu ve ark. (2016) ise yaptıkları çalışmada, bir glukokortikoid olan deksametazon ve BMP-2'yi birarada içeren bir sistem geliştirmişlerdir. Çalışmada PLGA filminden elde edilmiş alt tabaka üzerine öncelikle deksametazon yüklü PLGA nanopartiküller yüklenmiş ve nitrojen altında kurutulmuştur. Daha sonra oluşan tabaka kitozan çözeltisi içine daldırılıp yine aynı şekilde kurutulmuştur. Bu işlem beş defa tekrarlandıktan sonra, PLGA nanopartiküller yerine BMP-2'nin heparin çözeltisi içindeki karışımı ve kitozan çözeltisi ile aynı işlemler tekrarlanmıştır (Şekil 1.14). Çalışma sonucunda elde edilen *in vivo* deney sonuçlarına göre iki etken madde birlikte uygulandığı zaman kemik oluşumu hızlanmış ve artmıştır. Bunun sebebinin de deksametazonun BMP-2 ile sinerjik etki göstermesi olduğunu belirtmişlerdir (Qu ve ark., 2016).



Şekil 1. 14. Tabaka tabaka karma-kaplama (Qu ve ark., 2016)

1.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Polimerlerle İlgili Genel Bilgiler

Çalışmada hazırlanmış olan film formülasyonları için polimer olarak kitozan ve aljinat, nanopartikül formülasyonları için ise poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) kullanılmıştır.

1.4.1. Kitozan

Kitozan, antibakteriyel, biyobozunur, biyouyumlu, mukoadezif, hemostatik ve toksik olmayan yarı sentetik bir polimerdir (Khan ve ark., 2018; Kumria ve ark., 2018; Xie ve ark., 2018). Kitozan, doğal polimerler arasından ayrılan bu özellikleri sebebiyle ilaç salım sistemlerinin imalatı için dikkat çekici bir seçenek olarak kendini göstermiştir (Aktas ve ark., 2005a; Sah ve ark., 2019).

Kitozan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir. Kitin, doğada en bol bulunan ikinci polisakarittir ve karides, ıstakoz, mantar, böcek ve bazı algler gibi pek çok kaynaktan elde edilebilmektedir. Kimyasal olarak, kitin, β -(1, 4)-bağlı N-asetil-glukozamin birimlerinden oluşan düz bir homopolimerdir; kitozan da tekrarlayan glukozamin ve N-asetil-glukozamin birimlerinden oluşur (Şekil 1.15). Glukozamin / N-asetil glukozamin arasındaki oran, deasetilasyon derecesi olarak bilinmektedir. Zayıf bazik yapısı ile, asidik ortamda ($\text{pH} < 6,5$) çözünür fakat organik çözücüler ile suda ($\text{pH} \geq 7$) çözünmez (Aktas ve ark., 2005b; Kilicarslan ve ark., 2018; Sah ve ark., 2019; Unagolla ve Jayasuriya, 2018).

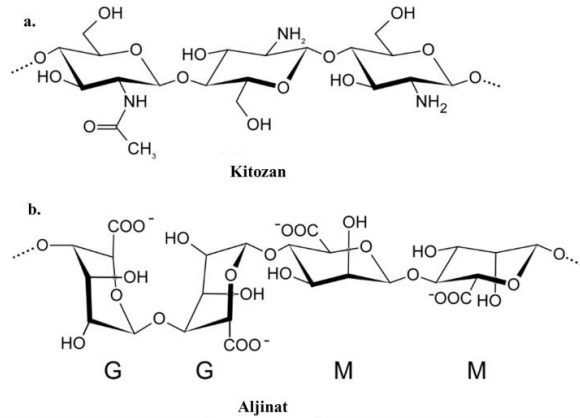
Kitozanın antibakteriyel etkisinin incelendiği çalışmalar sonucunda, kitozan üzerindeki amino grubunun bakteriyel hücre yüzeyindeki negatif yüklü karboksilatlarla birleşmesi sonucu hücre içi içeriğinin sızması veya blokajı ile olduğu açıklanmıştır. Kitozanın yara iyileştirici etkisinin gözlemlendiği pek çok çalışma da bulunmaktadır. Bunun haricinde literatürdeki bazı *in vitro* deney sonuçları, kitozanın osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasını kuvvetlendirdiğini ve periodontal kemik oluşumunu kolaylaştırabileceğini göstermektedir (Sah ve ark., 2019). Ayrıca tümör nekroz faktör ve interlökin-1 gibi sitokinleri uyararak bir anti-inflamatuar ilaç olan prednisolon ile benzer etki gösterdiği de çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır (Davydova ve ark., 2016).

1.4.2. Aljinat

Aljinat, farmasötik, biyomedikal, kozmetik ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan biyoyumlu ve toksik olmayan, anyonik karakterde bir polisakarittir (Mirtic ve ark., 2018; Ravichandran ve Jayakrishnan, 2018; Xie ve ark., 2018). Kahverengi alglerden elde edilen lineer bir polisakarittir ve bu yapısını (1, 4)-bağlı β -D-mannuronat ve (1, 4)-bağlı α -L-guluronat oluşturur (Şekil 1.15) (Kondaveeti ve ark., 2018; Ravichandran ve Jayakrishnan, 2018).

Aljinat suda çözünür bir polimerdir (Unagolla ve Jayasuriya, 2018). Suda çözünürlüğü, onu çözündüğü ortamda kimyasal olarak kararsız hale getirirse de, Ca^{+2} , Zn^{+2} , kitozan ve polietilenimin gibi çok değerlikli katyonlarla iyonik jelasyonla kolayca katı ve stabilize bir yapı oluşturabilir (Kilicarslan ve ark., 2018; Lee ve ark., 2018).

Aljinat ayrıca yara eksüdasını emebilir, iyon değişimini sağlayabilir, yara iyileşmesini teşvik etmek için nemli bir ortam sağlayabilir (Wang ve ark., 2017). Tüm avantajlarının yanında özellikle kitozan ile oluşturduğu polielektrolit kompleks yapısı ile yara örtüsü, doku mühendisliği, ilaç salım sistemlerinin oluşturulması gibi pek çok medikal alanda güncel araştırma konusu olan polimerler arasındadır (Kilicarslan ve ark., 2018; Venkatesan ve ark., 2017).



Şekil 1. 15. Kitozan (a) ve aljinatın (b) kimyasal yapısı (Gierszewska ve ark., 2018)

1.4.3. Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA)

Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), otuz yılı aşkın bir süredir ilaç salım sistemleri ve doku mühendisliği uygulamaları için kullanılan en cazip polimerler arasındadır. PLGA, biyouyumlu ve biyobozunurdur, çok çeşitli erozyon süreleri gösterebilmektedir. Değiştirilebilir mekanik özelliklere sahiptir ve en önemlisi, FDA onaylı bir polimerdir. Özellikle, ticari veya araştırma amaçlı, küçük molekülü ilaçların, proteinlerin ve diğer makromoleküllerin kontrollü salımını sağlayabilmek için PLGA ile kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Dalpiaz ve ark., 2016; Del Castillo-Santaella ve ark., 2019; Ding ve Zhu, 2018; Khan ve ark., 2018; Makadia ve Siegel, 2011; Rauta ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2016; S. J. Sun ve ark., 2018; Taghavi ve ark., 2017).

Moleküler ağırlık ve polidispersite indeksi gibi fiziksel özellikler, polimerin mekanik gücünü ve bir ilaç salım sistemi olarak formüle edilebilirliğini etkiler. Ayrıca bu özellikler polimerin biyobozunma hızını ve hidrolizini kontrol edebilir. Bu sebeple ticari olarak ulaşılabilir PLGA türleri genel olarak intrinsik viskozite veya molekül ağırlığı ile karakterize edilmektedir (Jain, 2000).

Mekanik dayanıklılık, şişme davranışı, hidrolize uğrama kapasitesi ve daha sonra biyolojik parçalanma hızı, PLGA polimerinin kristallliği ile doğrudan ilişkilidir. Elde edilen PLGA kopolimerinin kristallenmesi, kopolimer zincirindeki ayrı ayrı monomer bileşenlerinin (laktik ve glikolik) türüne ve molar oranına bağlıdır. 50: 50 oranında laktik ve glikolik asit içeren PLGA polimerleri, her iki monomerden daha yüksek oranda içerenlere kıyasla daha hızlı hidrolize olmaktadır. Laktik asit, glikolik asitten daha hidrofobiktir ve bu nedenle laktik asit bakımından zengin PLGA kopolimerleri daha az hidrofildir, daha az su emer ve daha yavaş bozulur (Jain, 2000).

PLGA kopolimerlerinin camsı geçiş sıcaklığı (T_g), 37°C fizyolojik sıcaklığın üzerindedir ve bu nedenle salım sistemi olarak kullanıldığında da camsı haldedir. Bu da PLGA'nın avantajlı olmasını sağlayan bir özelliktir (Jain, 2000).

PLGA kopolimeri hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak, sulu bir ortamda, omurga ester bağlarının ayrılması yoluyla (hidrolitik bozunma veya biyobozunma) bozunur. Polimer zincirleri toplu degradasyona uğrar ve degradasyon PLGA matrisi boyunca aynı oranda gerçekleşir. Biyolojik parçalanma sırasında PLGA zincirinde bulunan her bir polimer zinciri ayrıldıkça karboksilik uç grupları sayıca artmaktadır ve bu durumun da biyobozunmayı katalizlediği bilinmektedir. PLGA kopolimerlerinin biyobozunma hızı, polimer zincirindeki laktik ve glikolik asitlerin molar oranına, polimerin molekül ağırlığına ve kristallik derecesine bağlıdır (Jain, 2000).

PLGA degradasyonu için üç fazlı bir mekanizma ileri sürülmüştür (Jain, 2000);

1. İlk faz rastgele zincir ayrılmasıdır. Polimerin moleküler ağırlığı önemli ölçüde azalır, fakat önemli bir ağırlık kaybı olmaz ve çözünür monomer ürünleri oluşmaz.
2. Orta fazda, hızlı kütle kaybı ve çözünür oligomerik ve monomer ürünler eşliğinde moleküler ağırlıkta bir azalma meydana gelir.
3. Son aşama çözünebilir oligomerik parçalardan çözünür monomer ürünlerinin oluşmasıdır. Bu faz polimerin tamamen çözünme aşamasıdır.

PLGA, laktik ve glikolik asitlere parçalanır. Laktik asit, trikarboksilik asit döngüsüne girer ve metabolize edilir ve daha sonra karbon dioksit ve su olarak vücuttan atılır. Glikolik asit, böbreklerden değişmeden atılır veya trikarboksilik asit döngüsüne girer ve sonunda karbon dioksit ve su olarak elimine edilir (Jain, 2000).

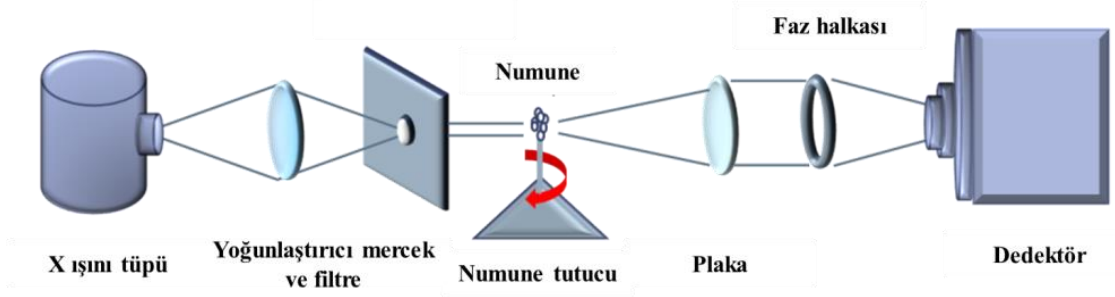
Çalışmamızda son yıllarda kemik rejenerasyonu incelemelerinde kullanımı artan mikro bilgisayarlı tomografi ile hem *in vitro* ilaç taşıyıcı sistemlerin hem de *in vivo* kemik iyileşmesi incelemelerinin yapılmasının yapı aydınlatmada literatüre yeni bir yöntem getirme ve 3 boyutlu inceleme ile film nanopartikül, nanopartikül greft ya da film içinde nanopartikül ve greft üçlemelerinin 3 boyutlu incelemelerinin ilaç şeklini geliştirmede avantaj ve yeni bir yöntem olabileceği düşünülmüştür. Bu bölümde formülasyonların özelliklerinin incelenmesi ve *in vivo* çalışmalarda kullanılan bu teknik ile ilgili özet bir bilgi sunulmaktadır:

1.5. Bilgisayarlı Tomografiyle Üç Boyutlu Analiz

Bilgisayarlı tomografi (BT) ile görüntüleme ilk olarak 1970'lerin başında geliştirilmiş ve o zamandan beri klinik tanısız görüntüleme üzerinde büyük bir etkisi olmuştur. Çoklu görüntüleme açıları kullanarak yeniden oluşturulan BT görüntüleri, geleneksel bir radyografi görüntüsüne kıyasla, bir nesnenin içindeki madde yoğunluğunun uzamsal dağılımı hakkında nicel bilgi sağlamaları bakımından önemli bir avantaja sahiptir. Geleneksel radyografi ise, X ışını yolu boyunca yalnızca maddesel zayıflamanın toplamı hakkında bilgi verebilir. Klinik BT tarayıcıları tipik olarak 1 mm³ hacim elementlerinden (vokseller) oluşan görüntüler üretirken, 1980'lerin başında geliştirilen mikro bilgisayarlı tomografi (mikro-BT) sistemleri 1-50 µm aralığında voksel aralığı sağlamaktadır (Guldborg ve ark., 2003; Swain ve Xue, 2009).

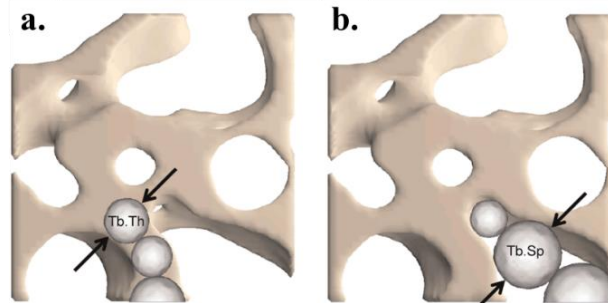
Seramikler, polimerler ve mineralleşmiş dokular dahil olmak üzere doğrudan mikro-BT kullanılarak çok çeşitli materyaller incelenebilmektedir. Hatta kan damarları dahil yumuşak dokuların da mikro-BT ile görüntülenebildiği belirtilmektedir. Yeni nesil mikro-BT sistemleri *in vivo* görüntülemeye ve dolayısıyla sürekli veri toplanmasına olanak sağlamaktadır (Guldborg ve ark., 2003; Swain ve Xue, 2009).

Mikro-BT teknik olarak konik ışıklı bilgisayarlı tomografi tekniği olup, bu sistemde tomografik düzenlemelerde ve geri-izdüşüm işlemi için konik geometriye sahip X ışınları kullanılmaktadır. Tarama işlemi görüntülenmek istenilen alan etrafında 180° veya 360° lik rotasyon ile gerçekleştirilmektedir. Bu izdüşümler ile oluşturulan dijital veriler, yeniden yapılandırma (rekonstrüksiyon) algoritması ile görüntüye çevrilmektedir (Şekil 1.16) (Guldborg ve ark., 2003; Swain ve Xue, 2009).



Şekil 1. 16. Standart masaüstü mikro-BT tarayıcısı

Mikro-BT voksel aralığı hacimsel olarak (sinyalin alındığı bölgenin hacmi) normal tomografilere göre neredeyse 1 milyon kat daha küçük olup, 1–50 μm 'dir. Bu küçük voksel aralığı sayesinde mikro-BT kesitsel olarak çok iyi bir çözünürlüğe sahiptir ve nesnelerin detayları ve iç kusurları hakkında daha net bir inceleme olanağı sağlamaktadır. Görüntüleme işlemi tahribatsız olduğu için, aynı numunenin iç özellikleri birçok kez incelenebilir ve ilave biyolojik ve mekanik testler için taramadan sonra numuneler tekrar kullanılabilir. Görüntüler işlenip yeniden oluşturulduktan sonra, materyal mikro yapısının 3D morfometrik parametrelerini tahmin etmek için, doğrudan veya dolaylı yöntemler kullanılarak analizler yapılabilir. Geleneksel dolaylı yöntemler, belirli bir yapısal formu (örneğin, plaka benzeri) varsayan 2D stereoloji denklemlerinden elde edilen tahminlere dayanmaktadır. Doğrudan yöntem ise, her görüntü vokselindeki yapıların arasına küreler yerleştirilerek kalınlık veya aralık gibi yerel parametreleri tahmin eder (Şekil 1.17) (Guldberg ve ark., 2003; Swain ve Xue, 2009).



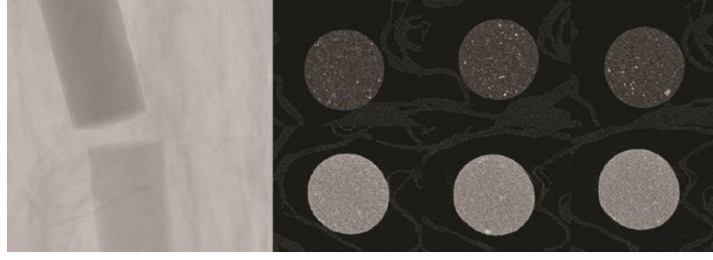
Şekil 1. 17. Trabeküler kalınlık (a) ve boşlukların (b) hesaplanmasında direkt 3D yöntemde kullanılan algoritmanın şematik gösterimi (Bouxsein ve ark., 2010)

Mikro-BT ile güvenilir sonuçlar elde etmenin ilk yolu doğru görüntüyü elde edebilmektir. Bu sebeple çalışmalarda özellikle kullanılan tarama ortamı, X ışını tüpü potansiyeli, voksel boyutu, ilgi bölgesi/ilgi alanı (region of interest - ROI, ilgi hacmi (volume of interest - VOI), kullanılan filtre gibi yöntem parametrelerine ait açıklamaların yapılması gerekmektedir (Çizelge 1.2) (Bouxssein ve ark., 2010).

Çizelge 1. 2. Mikro-BT tarama doğruluğu için anahtar parametreler (Bouxssein ve ark., 2010)

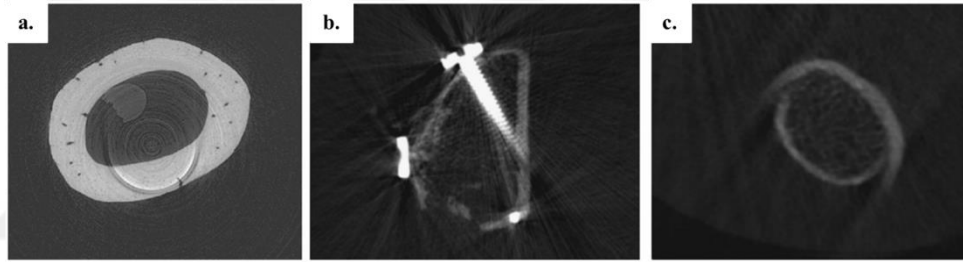
Değişken	Tanım	Standart birim
Voksel boyutu	Mikro-BT görüntüsünün soyut birimini tanımlayan üç boyut	μm^3
X ışını enerjisi	X ışını fotonlarının frekansı ile orantılıdır.	keV
X ışını tüpü potansiyeli	X ışını fotonları üretmek için elektronları hızlandıran X ışını tüpünün uygulanan tepe elektrik potansiyeli	kVp
X ışını yoğunluğu	X ışını tüpü akımı	$\mu\text{A}\cdot\text{s}$; μA
Entegrasyon süresi	Her tomografik projeksiyonun süresi	Ms
Çatı ortalaması	Her tomografi projeksiyonunda tekrarlanan ölçüm sayısı	n
Projeksiyonlar	Rekonstrüksiyonda kullanılan tomografik izdüşüm sayısı	n

Bir mikro-BT taramasından en yüksek kalitede görüntüler ve en doğru sonuçları elde etmek için, sistem düzgün şekilde çalışmalı ve görüntü verilerinde tarama kaynaklı yapaylıklar elimine edilmelidir. Kullanıcılar, üreticinin mikro-BT tarama sistemlerine özgü kalite kontrol talimatlarını takip etmelidir. Bunun için ilk önce kalibrasyon yapılmalıdır. Bir numunenin yoğunluğunun hesaplanmasında mikro-BT taramasından elde edilecek sonuçlar kullanılacaksa, mikro-BT sisteminin, ölçülecek numuneler için beklenen yoğunluk aralığında olan, bilinen yoğunluktaki kalibrasyon fantomu kullanılarak uygun şekilde kalibre edilmesi gerekir. Genellikle kemik taramalarında kalibrasyon için, santimetreküp başına gram (g/cm^3) eşdeğer mineral içeren katı haldeki kalsiyum hidroksiapatit (HA) kullanılmaktadır (Şekil 1.18) (Bouxssein ve ark., 2010).



Şekil 1. 18. Kalibrasyon için kullanılan hidroksiapatit fantom rodların yeniden yapılandırılmış mikro-BT görüntüleri (0,25 ve 0,75 gHAp cm⁻³) (Ozgul ve ark., 2015)

Tarama sonrasında görüntüler dikkatle incelenmelidir. Görüntüde oluşan hatalar, kaymalar ve parlamalar artefakt olarak adlandırılır. Bu sorunların görüntüye yansımalarını engellemek için operatörün ayarları hatasız şekilde yapması gerekmektedir. En sık rastlanan artefaktlar Şekil 1. 19 ile gösterilmiştir.



Şekil 1. 19. Halka artefaktı (a), metal artefaktı (b) ve hareket artefaktı (c) (Bouxsein ve ark., 2010)

Rekonstrüksiyon yapıldıktan sonra 3D görüntüler oluşturulur ve önemli bazı parametrelerin hesaplamaları gerçekleştirilir. Örneğin CTAn yazılım ile hesaplanabilen bazı parametreler Çizelge 1.3 ile açıklanmıştır.

Çizelge 1. 3. Önemli üç boyutlu morfometrik parametrelerin tanımları (Kim ve ark., 2015)

Parametre	Tanım	Kısaltma (Birim)
Doku hacmi	VOI'nin tamamı	TV (mm ³)
Kemik hacmi	VOI içindeki eşleştirilmiş (binarize) nesnelerin tamamı	BV (mm ³)
% Kemik hacmi	VOI'deki eşleştirilmiş katı nesnelerin oranı	BV/TV (%)
Kemik yüzey alanı	VOI'deki tüm katı nesnenin yüzey alanı	BS (mm ²)
Trabeküler kalınlık	Trabeküler kemik kalınlığı	Tb.Th (mm)
Trabeküler ayrıklık	VOI içindeki binarizasyonla tanımlanan boşlukların kalınlığı	Tb.Sp (mm)
Anizotropi derecesi	3D simetri veya hizalanmasının varlığı veya yokluğu	DA

Mikro-BT her ne kadar detaylı ve üç boyutlu tarama anlamında iyi olsa da mikro-BT ve nano-BT ile yapılan kıyaslama çalışmaları ile nano-BT ile daha doğru ve daha detaylı kalitatif ve kantitatif sonuçlar elde edilebildiği araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Huang ve ark., 2017; Kampschulte ve ark., 2016; Kilicarslan ve ark., 2020; Schmitt Rahner ve ark., 2018). Mikro-BT ve nano-BT arasındaki teknik farklılıklar Çizelge 1.4 ile gösterilmektedir.

Çizelge 1. 4. *In vivo* mikro-BT, *in vitro* mikro-BT ve nano-BT teknik özellikleri (Kampschulte ve ark., 2016)

Parametre	<i>In vivo</i> mikro-BT	<i>In vitro</i> mikro-BT	Nano-BT
Tüp dizaynı	Yansıma tüpü	Yansıma tüpü/İletim tüpü	İletim tüpü
Odak boyutu	50-200 µm	1-50 µm	<400 nm
Tüp voltajı	20-90 kVp	20-130 kVp	8-190 kVp
Tüp gücü	10-300 W	1-50 W	8-25 W
Çözünürlük	50-200 µm	5-100 µm	50-600 nm
Tarama süresi	0,1-30 dakika	10-300 dakika	60-180 dakika
Dedektör	CCD/Flat panel dedektör	CCD/Flat panel dedektör	CCD/Flat panel dedektör

1.6. Çalışmada Kullanılan Etken Maddelerle İlgili Genel Bilgiler

1.6.1. Kemik Morfogenetik Protein

Osteojenik protein olarak da bilinen BMP, 1965 yılında Marshall R. Urist tarafından keşfedilmiştir (Urist ve Strates, 1971). Yapılan çalışmalar TGF- β süperfamilyasından olan BMP ailesi üyelerinin kademeli olarak mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara, yani kemik oluşumunu sağlayan hücrelere göçü ile kemik oluşumunu başlattığını ortaya koymuştur. Bunun dışında anjiyogenez de kemik rejenerasyonu için oldukça önemlidir. Anjiyogenez süreci önceden var olan damar ağı içinde yeni damar oluşumunu kapsamaktadır. Yeni oluşan damarlar kemiğin yeniden yapılması için gerekli olan besin desteği, makromoleküllerin taşınması ve gerekli metabolik çevrenin oluşması süreçleri için de oldukça önemlidir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) kemik oluşumu esnasında olması gereken anjiyogenez için

kilit bir düzenleyici büyüme faktörüdür (Kempen ve ark., 2009; Zeisberg ve Kalluri, 2008).

BMP'ler, mezenkimal hücre üzerindeki hücre yüzey reseptörlerine bağlandıklarında, bir sinyal dizisi aktive edilir. Sinyaller, spesifik proteinler yoluyla hücre çekirdeğine gönderilir. Bu durum, kırık ve kemik oluşumunda rol oynayan makromoleküllerin sentezine yol açan genlerin ekspresyonu ile sonuçlanır ve mezenkimal hücre kondrosit veya osteoblast olur. BMP implantasyonu, mezenkimal hücre infiltrasyonu, kırık oluşumu, vaskülarizasyon, kemik oluşumu ve nihayetinde hematopoetik kemik iliği elementlerinin toplanması ile birlikte kemik dokusunun yeniden yapılandırılması dahil olmak üzere karmaşık bir dizi hücresel olay ile sonuçlanmıştır (Jain ve ark., 2013).

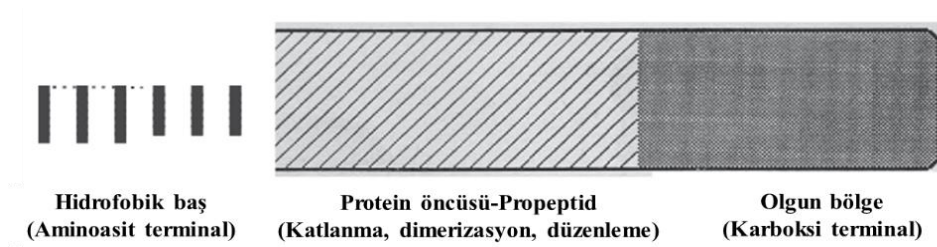
Kemik rejenerasyonunda çok fazla hücre türü ve biyomolekülün kendine ait görevi gerçekleştirmesi gerekir. Bu nedenle de tedavinin her basamağa uygun büyüme faktörü ile desteklenmesi gerektiği düşünülebilir. Fakat BMP'ler rejenerasyondaki diğer basamaklarla bağlantı kurmakta ve diğer faktörlerin de salınmasını ve rejenerasyona katılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle de kemik rejenerasyonu için büyüme faktörleri içinde en önemlisi olarak kabul edilebilir (Kim ve Tabata, 2015; Lienemann ve ark., 2012). 20'den fazla BMP türü tanımlanmış olsa da, doku mühendisliğinde en çok kullanılan BMP-2 ve BMP-7'dir (Çizelge 1.5) (Blackwood ve ark., 2012; Jain ve ark., 2013; Reddi, 1992; Reddi, 1998).

Çizelge 1. 5. Memelilerdeki BMP süperfamilyası (Reddi, 1998)

BMP alt familyası	Jenerik ad	BMP ismi	
BMP-2/4	BMP-2A	BMP-2	
	BMP-2B	BMP-4	
BMP-3	Osteogenin	BMP-3	
	Büyüme/Farklılaşma Faktörü-10 (GDF-10)	BMP-3B	
Op-1/	BMP-5	BMP-5	
BMP-7	Vejetal faktör-1 (Vgr-1)	BMP-6	
	Osteojenik protein-1 (Op-1)	BMP-7	
	Osteojenik protein-2 (Op-2)	BMP-8	
	Osteojenik protein-3 (Op-3)	BMP-8B	
	Büyüme/Farklılaşma Faktörü-2 (GDF-2)	BMP-9	
	BMP-10	BMP-10	
	Büyüme/Farklılaşma Faktörü-11(GDF-11)	BMP-11	
	GDF-5,6,7	Büyüme/Farklılaşma Faktörü-7(GDF-7) veya Kıkırdak türevi morfojenetik protein-3 (CDMP-3)	BMP-12
		Büyüme/Farklılaşma Faktörü-6(GDF-6) veya Kıkırdak türevi morfojenetik protein-2 (CDMP-2)	BMP-13
	Büyüme/Farklılaşma Faktörü-5(GDF-5) veya Kıkırdak türevi morfojenetik protein-1 (CDMP-1)	BMP-14	
		BMP-15	BMP-15

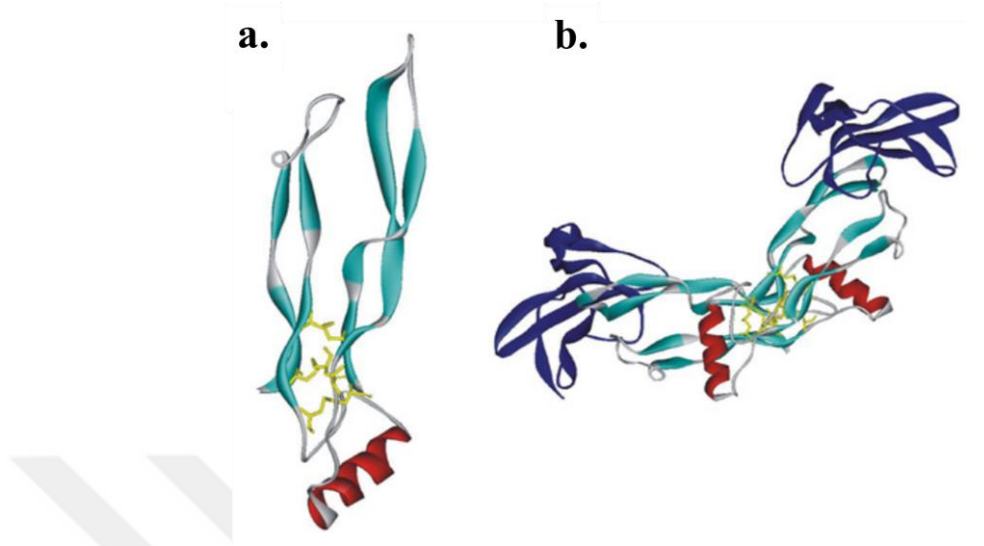
BMP-7'nin yapısal organizasyonu:

BMP'nin yapısı Şekil 1.20 ve Şekil 1.21 ile şematize edilmiştir.



Şekil 1. 20. BMP'nin yapısal organizasyonu (Jain ve ark., 2013)

BMP-7'nin molekül yapısı:



Şekil 1. 21. BMP-7'nin moleküler grafiği (monomerik (a) ve dimerik (b)) (Rider ve Mulloy, 2010)

Sembolleri: BMP-7, OP-1

Molekül ağırlığı: 26 kDa

Organoleptik özellikler: Beyaz liyofilize toz

Çözünürlük: Suda iyi çözünür.

Saklama koşulları: % 0,1 bovin serum albumin çözeltisi içinde -20 °C'de saklanmalıdır.

Farmakolojik özellikler: Osteoindüktif, kemik kırıklarında, kaynamayan kırıklarda ve spinal fizyon tedavisinde BMP-2 ve BMP-7 FDA onaylıdır (Gan ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018). BMP-2 kemik rejenerasyonunda altın standarttır (Kim ve ark., 2018).

1.6.2. Klindamisin Fosfat

Klindamisin fosfat (Şekil 1.22), dental ve periodontal tedavide sıkça tercih edilen, geniş spektrumlu, başta gram-pozitif anaeroblara olmak üzere bakteriyostatik etki gösteren bir antibiyotiktir (Kilicarslan ve ark., 2014b; Mohamed ve ark., 2015). Klindamisin bakterilerin mukoza yüzeyindeki epitel hücrelere yapışmasını azaltarak ürettikleri zararlı faktörleri inhibe ettiği kanıtlanan tek antibiyotiktir (Brook ve ark., 2005). Dental ve periodontal uygulamalar için genel olarak kullanılan dozu günde 4 kez 150 mg ile günde 4 kez 300 mg arasında değişmektedir. Sistemik uygulamaya kıyasla lokal uygulama ile dişeti oluğu sıvısında yüksek etken madde derişimlerine ulaşılabilir (Kilicarslan ve ark., 2014b).

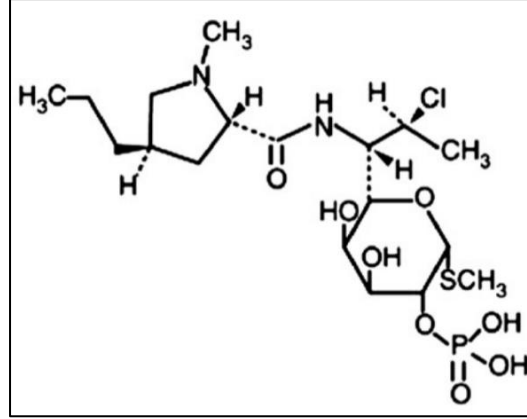
Klindamisin fosfat ile dental uygulamalar için mikroküre ve film formülasyonları geliştirilmiştir. Suda çok iyi çözünürlüğü olan bu etken maddenin kontrollü salım yapan sistemlerini geliştirmek için farklı polimerlerle çeşitli film formülasyonları denenmiş ve *in vitro* çözünme hızı deneyleri ile salımın altı saate kadar uzatılmış olduğu belirlenmiştir (Kilicarslan ve ark., 2014b; Kilicarslan ve ark., 2018; Kilicarslan ve ark., 2015b).

Klindamisin fosfat hücre penetrasyonunun iyi olması, dental tedavide tercih ediliyor olması, etkin olması, kemiğe penetrasyonunun iyi olması gibi özellikleri nedeniyle bu çalışma için antimikrobiyal ajan olarak seçilmiştir (Gironi ve ark., 2018; Gonzalez ve ark., 2018; Karczewski ve ark., 2018; Kilicarslan ve ark., 2014b; Kilicarslan ve ark., 2018; Rauta ve ark., 2016).

Klindamisin fosfatın bazı kimyasal, fiziksel ve farmakolojik özellikleri şu şekilde özetlenebilir (EP9.0, 2017; USP30, 2007);

Kapalı formül: C₁₈H₃₄ClN₂O₈PS

Kimyasal yapısı:



Şekil 1. 22. Klindamisin fosfatın kimyasal yapısı (Kim ve Park, 2012)

Kimyasal okunuşu: Metil 7 – kloro - 6, 7, 8 – trideoksi - 6- (1 – metil – trans – 4 – propil – L – 2 - pirolidin karboksamid) – 1 – tio – L – treo – α – D – galakto - oktopiranosid 2 - (dihidrojen fosfat)

Molekül ağırlığı ve erime sıcaklığı: 504,97 g/mol, 114 °C

Organoleptik özellikleri: Beyaz veya beyazımsı, hafif nem çeken toz

Çözünürlük: Su içinde serbestçe çözünebilir, etanolde çok az çözünür (%96'lık), metilen klorür içinde hemen hemen hiç çözünmez.

Saklama koşulları: 25°C'de, ağzı sıkıca kapalı kaplarda, ışıktan korunarak saklanmalıdır (USP30).

Farmakolojik özellikler: Klindamisin fosfat gram-pozitif aerob ve hem gram-negatif hem de gram-pozitif anaerob patojenlere karşı kullanılan antimikrobiyal bir ajandır (İbrahim ve ark., 2016; Kilicarslan ve ark., 2010; Lindeboom ve ark., 2006). Klindamisin ağız içi enfeksiyonlarda, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında, kadınlarda pelvis ve ürogenital sistem enfeksiyonlarında, periferit ve endokardit profilaksisinde antibakteriyel olarak kullanılmaktadır (Mohamed ve ark., 2015; Wong ve ark., 2016).

Literatür taramasından elde ettiğimiz verilere göre antibiyotik etkili ve kemik rejenerasyonu tedavisi sağlayan maddeleri birlikte ihtiva eden bir ilaç taşıyıcı sistem bulunmamaktadır. Bu nedenle ***çalışmamızın amacı***; cerrahi olarak uygulanabilen, biyolojik ortamda bozunabilen sentetik ve doğal polimerlerden yararlanarak bu iki grup etken maddeyi bir arada taşıyabilen bir ilaç şekli geliştirmektir. Bu amaçla, öncelikle etken maddenin ilaç şeklinden uygulama bölgesine salımını modifiye edebilmek ve/veya kontrollü salımını sağlayabilmek amacıyla, seçilmiş olan etken maddelerin ayrı ayrı ve birlikte nanopartiküler sistem haline getirilmesi, sonra oluşturulan partiküler sistemlerden *in vitro* salım özellikleri uygun olan formülasyonların seçilmesi ve dental uygulamalarda kullanılan greft ya da film materyali içerisine yüklenmesi ile yeni bir ilaç şeklinin oluşturulması düşünülmüştür.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Maddeler

Aljinik asit sodyum tuzu (100-300 cp)	: Sigma / ABD
Aljinik asit sodyum tuzu (≥ 2000 cp)	: Sigma / ABD
Alloplastik greft	: Merries International Inc. / Tayvan
Asetik asit	: Merck / Almanya
Asetonitril	: Sigma-Aldrich / ABD
BCA kit	: Thermo Scientific / ABD
Bovin serum albumin	: Sigma-Aldrich / ABD
Cerrahi suture	: Upline Medical / Çin
Dekalsifikasyon sıvısı (Osteodec)	: Bio Optica / İtalya
Diklorometan	: Lab-Scan / İrlanda
Disodyum hidrojen fosfat	: Sigma-Aldrich / ABD
Diyaliz membran (Cutoff: 14000 Da)	: Sigma-Aldrich / ABD
Diyaliz membran klipsleri (Spectra/Por)	: SpectrumLabs Inc. / ABD
Doku kapama ortamı (Mounting media)	: Bio Optica / İtalya
Düşük molekül ağırlıklı kitozan (50-190 kDa)	: Aldrich / ABD
Enjektör (5 cc ve 10 cc – 21G)	: Beybi / Türkiye
Eosin	: Bio Optica / İtalya
Formaldehit (% 37 a/h)	: Acros Organics / ABD
Glasiyel asetik asit	: Merck / Almanya
Hematoksin	: Bio Optica / İtalya
İnsülin enjektörü (26G)	: Beybi / Türkiye
Kalsiyum klorür	: Aklar Kimya / Türkiye
Kemik morfogenetik protein-7 (BMP-7)	: PeptoTech / Birleşik Krallık
Kemik morfogenetik protein-7 ELISA kit	: Sigma-Aldrich / ABD

Ketamin (Alfamine)	: Ata Fen / Türkiye
Klindamisin fosfat	: DEVA / Türkiye
Ksilazin (Xylased)	: Bioveta / Türkiye
Ksilen	: Tekkim / Türkiye
Mikrotom bıçağı	: Feather / Japonya
Müsin	: Carl Roth / Almanya
Orta molekül ağırlıklı kitozan (190-310 kDa)	: Aldrich / ABD
Ortofosforik asit	: Aklar Kimya / Türkiye
Parafin (Histowax)	: Poth Hille / Birleşik Krallık
PLGA (MW: 24-38 kDa)	: Sigma-Aldrich / Almanya
PLGA (MW: 7-17 kDa)	: Sigma-Aldrich / Almanya
PLGA (MW: 76-115 kDa)	: Sigma-Aldrich / Almanya
PVA (Mowiol 4-88, MW:31 kDa)	: Sigma-Aldrich / ABD
Potasyum dihidrojen fosfat	: Merck / Almanya
Propilen glikol	: Aklar Kimya / Türkiye
Rond frez	: Addent / ABD
Sodyum azid	: Himedia / Hindistan
Sodyum klorür	: Kimetsan / Türkiye
Yüksek molekül ağırlıklı kitozan (310-375 kDa)	: Fluka / İsviçre

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalkalayıcı inkübatör	: Thermo Scientific (MaxQ Mini 4450) / ABD
Ayrımsal Tarama Kalorimetresi	: Shimadzu (DSC 60) / Japonya
Doku Takip Cihazı (Leica TP1020)	: Leica / ABD
Fizyodispenser (Mikromotor)	: Saeshin (STR-XC1) / Kore
FTIR	: Shimadzu (8040) / Japonya
Hassas terazi	: Sartorius (BL 210S) / Almanya
Homojenizatör (Ultra Turrax)	: IKA, Labotechnik / Almanya

Liyofilizatör	: Christ / Almanya
Manyetik karıştırıcı	: Daihan Scientific / Güney Kore
Mikro bilgisayarlı tomografi yazılımları	: Bruker (NRecon ve CTAn) / Belçika
Mikro-bilgisayarlı tomografi	: Bruker (SkyScan 1272 ve 1275) / Belçika
Mikrometre	: NSK / Japonya
Mikroplaka okuyucu	: Molecular devices (SpectraMax 190) / ABD
Nano-bilgisayarlı tomografi	: Bruker (Skyscan 2214) / Belçika
Optik mikroskop (Leica DM 4000)	: Leica / Almanya
Optik mikroskop (Olympus BX51)	: Olympus / ABD
Optik mikroskop kamerası	: Leica / Almanya
Partikül büyüklüğü tayin cihazı	: Malvern (Zeta sizer-NanoZS) / İngiltere
pH metre	: Mettler Toledo / ABD
Prob sonikatör	: Bandelin (Sonopuls) / Almanya
SEM kaplama cihazı (Gatan 682 PECS)	: Gatan / ABD
SEM Quanta 400F Field Emission (ODTÜ MerLab)	:Thermo Fisher Scientific-FEI / Almanya
SEM Quanta 200F Field Emission (Bilkent UNAM)	:Thermo Fisher Scientific-FEI / Almanya
Tekstür analiz cihazı (TA-XT Plus)	: Stable Micro Systems / Birleşik Krallık
Ultrasaf su cihazı	: Millipore / ABD
Ultrasantrifüj	: Sigma / Almanya
Ultrasonik banyo	: Ultrasonic (LC 30) / Almanya
Viskozimetre	: Brookfield (RVTDV-2 ve LVDV-I Prime) / ABD
Vorteks	: Heidolph Reax-Top / Almanya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC)	: Agilent (1100 series) / ABD
Yüksek basınçlı sıvı kromatografi kolonu	: ACE (5 C18) / İskoçya

2.2. Yöntemler

2.2.1. Klindamisin Fosfat Üzerinde Yapılan Kontroller

2.2.1.1. Klindamisin Fosfatın Ayrımsal Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Saf haldeki klindamisin fosfatın ayrımsal tarama kalorimetresi (DSC) analizi yapılarak termal davranışı incelenmiştir. Bunun için yaklaşık 3 mg ağırlığındaki etken madde alüminyum pan içine konulmuş ve kapatılarak cihaza yerleştirilmiştir (Shimadzu DSC 60, Japonya). Numunenin 50 mL / dakika azot gazı akımı altında, 5 °C / dakika hızda, 30-300°C aralığında DSC termogramı alınmıştır.

2.2.1.2. Klindamisin Fosfat Miktar Tayini Yönteminin Belirlenmesi

Çalışmamızdaki hedeflerimizden biri dental cerrahi işlemler sırasında oluşabilecek enfeksiyon riskini azaltmaya yönelik ilaç şeklinin geliştirilmesidir. Bu nedenle etken madde salım özelliklerinin inceleneceği ortam olarak diş eti oluğu sıvısı pH'sını (pH 6,5-7,0 arası) yansıtabilecek olan bir çözünme ortamı tercih etmemiz gerekmiş ve bu nedenle de pH 6,75 fosfat tamponu ile çalışılmasına karar verilmiştir (Eggert ve ark., 1991; Kassem ve ark., 2015). Bu ortamda etken madde varlığının tespit edilebilmesi için bir etken madde tayin yöntemi seçilmesi gerekmektedir. Yayınlanmış literatürlerden tarama sonucu klindamisin ve klindamisin fosfat için yapılan çeşitli analiz yöntemlerinden biri olan yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) analiz yönteminin yaygın olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Batziar ve ark., 2004; Platzer ve White, 2006).

2.2.1.3. Çözünme Ortamının Hazırlanması

Deney ortamı olarak pH 6,75 fosfat tamponu kullanılmıştır (Kassem ve ark., 2015; Kilicarslan ve ark., 2014c). Tampon içeriği aşağıda yer almaktadır.

pH 6,75 Fosfat Tamponu İÇeriği

Disodyum hidrojen fosfat.....	2,38 g
Potasyum dihidrojen fosfat.....	0,19 g
Sodyum klorür.....	8 g
Sodyum azid.....	0,10 g
Distile su.....ym.....	1000 mL

Hazırlanışı: 1000 mL'lik balon jöjeye 2,38 g disodyum hidrojen fosfat, 0,19 g potasyum dihidrojen fosfat, 8 g sodyum klorür eklenmiştir. Daha sonra 1000 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Ardından 0,1 g sodyum azid ilave edilmiştir. Sodyum azidin eklenme sebebi uzun süreli *in vitro* etken madde çözünme hızı deneyleri sırasında mikrobiyal üremenin engellenmesidir. Daha sonra pH metre kullanılarak tampon pH'sı ortofosforik asit ile 6,75' e ayarlanmıştır.

2.2.1.4. Klindamisin Fosfatın HPLC ile Miktar Tayini

Klindamisin fosfatın *in vitro* çözünme ortamı ve nanopartiküller için yükleme etkinliği analizinin yapılacağı % 0,3 PVA çözeltisi içinde 1 mg/mL derişimde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözelti, 25 mg etken maddenin 25 mL ortam içerisinde tamamen çözünmesi ile elde edilmiştir. Buradan hareketle 40 µg/mL derişimdeki çözeltisi hazırlanmış ve çözeltinin 200 nm – 400 nm aralığında HPLC cihazı (Agilent 1100, Almanya, ACE5 C18 kolon (150×4,6 mm , 5 µm), İskoçya) ile kromatogramları alınmış ve maksimum absorbans verdiği dalga boyu belirlenmiştir.

Klindamisin fosfat için yapılmış olan literatür ve farmakope incelemeleri sonucunda miktar tayini yöntemi olarak HPLC yöntemi seçilmiş (Kilicarslan ve ark., 2010) ve mobil fazı oluşturan bileşenlerin kombinasyonu, mobil faz akış hızı, enjeksiyon hacmi gibi parametreler üzerinde denemeler yapılmış ve tekrarlanabilir ve kısa sürede istenen özellikte pik verebilen yöntem parametreleri tespit edilmiştir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2. 1. Klindamisin fosfatın HPLC ile yapılan miktar tayini çalışma parametreleri

Mobil faz	: Asetonitril : Fosfat tamponu (pH 2,5) (25:75 h/h)
Akış hızı	: 1 mL/dakika
Enjeksiyon Hacmi	: 20 µL
Kolon	: ACE5 C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm)
Dedektör	: UV dedektör, 210 nm
Sıcaklık	: 25 °C
Alınma Zamanı	: 3,8 dakika

2.2.1.5. Klindamisin Fosfatın *In vitro* Çözünme Ortamında ve % 0,3 PVA Çözeltisinde Kalibrasyonu

Klindamisin fosfatın tampon ortamı ve % 0,3 PVA çözeltisi içerisindeki 1 mg/mL derişimindeki stok çözeltilerinden hareketle 2 µg/mL ile 200 µg/mL arasındaki derişimlere seyreltme yapılarak her bir ortam için ayrı ayrı 9 farklı derişimde (2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL) çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 210 nm’de üç defa analiz edilmiştir. Derişime karşı elde edilen alan değerleri kullanılarak doğru denklemi bulunmuştur. Elde edilen kalibrasyon denklemi etken maddenin işlem etkinliği ve *in vitro* çözünme hızı tayininde kullanılmıştır.

2.2.2. BMP Üzerinde Yapılan Kontroller

BMP analizleri için enzim bağılı immünosorbent deneyi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) gerçekleştirilmiştir. Deneyler ELISA kit prosedürüne uyularak gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.1. BMP'nin ELISA Kit ile Kalibrasyonu

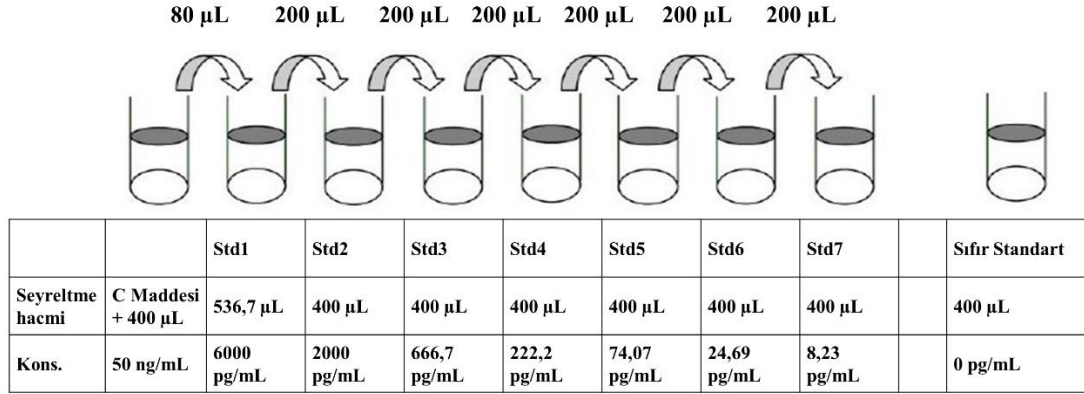
ELISA kit prosedürüne göre öncelikle konsantre çözeltiler için uygun seyreltmeler yapılmıştır (RAB0033).

1. Örnek seyreltme tamponu (E1); kullanılmadan önce ultra saf su (USS) ile 5 kat seyreltilmiştir.
2. Yıkama tamponu (B); kullanılmadan önce USS ile 20 kat seyreltilmiştir.
3. Biotinlenmiş tespit antikoru (F); vial santrifüjlenmiş ve 100 µL seyreltilmiş örnek seyreltme tamponu (E1) vialine eklenerek konsantre tespit antikoru çözeltisi hazırlanmıştır. Karıştırma işlemi yavaşça pipetleyerek gerçekleştirilmiştir. Oluşan bu çözelti konsantre tespit antikoru çözeltisi olup, her deney öncesinde gerekli miktarlar hesaplandıktan sonra E1 ile 80 kat seyreltilerek prosedürde kullanılmıştır.
4. HRP-Streptavidin (G); vial santrifüjlenmiş ve daha sonra çökelti olmuş olma ihtimaline karşı yavaşça pipetleyerek karıştırılmıştır. Konsantre HRP-Streptavidin (G), her deney öncesinde gerekli miktarlar hesaplanarak E1 ile 400 kat seyreltilerek prosedürde kullanılmıştır.
5. Standart BMP-7 (C); açılmadan önce vial santrifüjlenmiştir. 400 µL E1, vialine eklenerek 50 ng/mL stok standart çözelti hazırlanmıştır. Yavaşça pipetleyerek karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Kalibrasyon için sekiz adet boş ependorf tüpü hazırlanmış, ilkinde 586,7 µL diğerlerine 400 µL E1 koyulmuştur (Şekil 2.1). Hazırlanmış olan 50 ng/mL standart BMP-7 çözeltisinden 80 µL alınıp ilk ependorf tüpüne aktarılmış ve pipetleyerek karıştırılmıştır. Böylece 6000 pg/mL derişimdeki ilk kalibrasyon çözeltisi elde edilmiştir.

Hazırlanan bu çözeltilerden başlayarak her defasında 200 µL çözelti alınmış ve her defasında bir sonraki tüpüne aktarmak suretiyle seyreltme serisi (0 pg/mL, 8,23 pg/mL, 24,69 pg/mL, 74,07 pg/mL, 222,2 pg/mL, 666,7 pg/mL, 2000 pg/mL, 6000 pg/mL)

hazırlanmıştır. En son tüp sıfır standarttır (0 pg/mL) ve tüp içine sadece E1 koyulmuştur.



Şekil 2. 1. BMP-7 kalibrasyonu için seyreltme serisi hazırlanışının şematik gösterimi

Tüm çözeltiler oda sıcaklığına getirilip hazırlandıktan sonra ELISA kit deney prosedürüne göre kalibrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için ELISA kit içerisinde yer alan kuyulara her standarttan 100 µL eklenmiştir. Kuyular örtülerek oda sıcaklığında 2,5 saat hafifçe çalkalayarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyulardaki çözelti atılmış ve her kuyu ayrı ayrı her defasında 300 µL olacak şekilde 4 kez yıkama tamponu (B) ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra, kalan yıkama tamponunu tamamen uzaklaştırmak için plaka ters çevrilmiş ve temiz kağıt havlu ile kurutulmuştur.

Bu işlem sonrasında her kuyuya 100 µL seyreltik biyotinlenmiş tespit antikoru (F) eklenmiştir. Kuyuları örtülmüş ve hafifçe çalkalanarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda çözelti atılarak yıkama işlemi önceki adımdaki gibi tekrarlanmıştır.

Daha sonra her kuyuya 100 µL seyreltik HRP-Streptavidin (G) çözeltisi eklenerek kuyular örtülmüş ve hafifçe çalkalanarak 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda çözelti atılmış ve yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

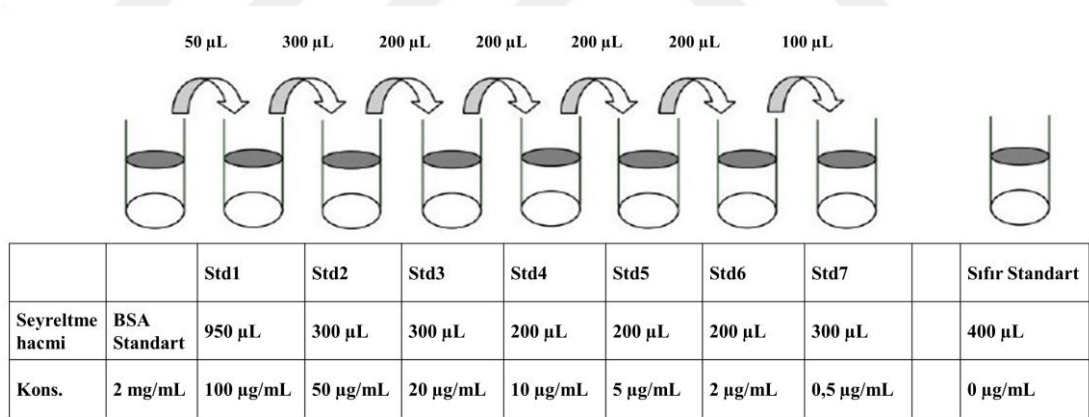
Son olarak her kuyuya 100 µL kolorimetrik TMB tek adımlı substrat reaktifi (H) eklenerek kuyular örtülmüş ve hafifçe çalkalanarak karanlıkta oda sıcaklığında 30

dakika inkübe edilmiştir. Süre dolduğunda ise her kuyuya 50 µL Durdurma Çözeltisi (I) eklenmiş ve hemen mikropilaka okuyucu (Molecular devices (SpectraMax 190) / ABD) kullanılarak 450 nm'de absorbansı okunmuştur.

2.2.2.2. BSA'nın BCA Kit ile Kalibrasyonu

BMP yerine model ilaç olarak kullanılmış BSA için bikinkoninik asitle (BCA) protein tayin kiti kullanılarak ve kitin mikropilaka prosedürüne uyularak deneyler gerçekleştirilmiştir. Kit içeriğinde BCA Reaktif A (0,1 M sodyum hidroksit içerisinde sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, bikinkoninik asit ve sodyum tartarat), BCA Reaktif B (% 4 kuprik sülfat) ve albumin standart (2 mg / mL) bulunmaktadır.

Standard BSA ampul numuneler ile aynı seyrelticiyi kullanarak temiz ependorf tüplerde seyreltilerek (Şekil 2.2) kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır.



Şekil 2. 2. BSA kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Mikropilaka prosedüründeki her örnek için gerekli 100 µL çalışma reaktifi stok olarak hazırlanmıştır. Bunun için de Reaktif A : B (50 : 1) karıştırılmıştır.

1. Her standarttan 25 µl alınarak mikropilaka kuyusu içine eklenmiştir (çalışma aralığı = 0,5-100 µg / mL).

2. Her kuyucuğa 100 µL çalışma reaktifi eklenmiş ve plaka örtülerek ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
3. Plaka oda sıcaklığına soğutulmuş ve plaka okuyucusu ile 562 nm'de absorbansı ölçülmüştür.
4. Her BSA standardı için elde edilmiş absorbanslar, kendi derişimine (µg / mL) karşılık gelecek şekilde çizilmiş ve standart bir eğri hazırlanmıştır. Bilinmeyen her numunenin protein derişimini belirlemek için bu standart eğri kullanılmıştır.

2.2.3. Kullanılan Analitik Yöntemlerin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, tasarlanan analitik uygulamalar için istenen şartları sağlayan yöntemin performans özelliklerinin laboratuvar çalışmalarıyla belirlendiği bir işlemdir. Performans özellikleri analitik parametrelere dayanarak açıklanır. Bu parametreler hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda kullanılan yöntemler için geçerlidir. Sadece kabul edilebilirlik sınırları değişebilir. Etken madde miktar tayininin validasyonunda kullanılan analitik parametreler aşağıda sıralanmıştır (Özkan ve ark., 2011; USP30).

Her parametrenin altında klindamisin fosfat için uygulanmış olan validasyon çalışması açıklanmıştır. BMP için ELISA yöntem validasyonu bulguları ELISA kit analiz sertifikası içinde belirtilmiştir. Bu veriler bulgular kısmında verilmiştir. Kısıtlı madde temin edilebilmesi sebebiyle ELISA uygulama sertifikasındaki bilgiler kabul edilmiş ayrıca validasyon yapılmamıştır.

2.2.3.1. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntemle elde edilen test sonuçlarının gerçek değere veya referans kabul edilmiş olan değere yakınlığının ölçüsüdür. Gerçek / teorik değerlerin, pratikte bulunan değerlere yakınlığının saptanmasını sağlar. Doğruluk,

belirli miktarda analiz edilen maddenin bilinen miktar tayini yöntemi ile % geri elde değerleri bulunarak hesaplanır. Doğruluk, belirli aralığı kapsayan en az üç derişim noktasında en az üçer kez hazırlanan numune miktarlarının yüzde geri eldelerinin belirlenmesi ile tayin edilmektedir (ICH-Q2(R1), 2005; USP30).

Klindamisin fosfatın PBS ve % 0,3 PVA çözeltisindeki 1 mg/mL derişimdeki stok çözeltileri kullanılarak, 5 µg/mL, 40 µg/mL, 100 µg/mL derişimdeki üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltiler HPLC kullanılarak altışar kere analiz edilmiştir. Elde edilen alan verileri yardımıyla pratik derişim ve % geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama % geri elde, standart sapma (SS) ve % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri belirlenmiştir.

2.2.3.2. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten çoklu örneklemeyle elde edilen ölçüm serileri arasındaki yakınlığı ifade eder. Kesinlik, normal işlem koşulları altında, yöntemin tekrarlanabilirliğinin, ara kesinliğinin ve tekrar elde edilebilirliğinin ölçüsüdür (ICH-Q2(R1), 2005).

Tekrarlanabilirlik; kısa zaman aralıklarında aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Belirli aralığı kapsayan en az üçer kez veya test derişiminin %100'ünde en az altı ölçümle belirlenir. Sonuçlar, hesaplanan derişimlerin ortalaması, SS ve % BSS olarak verilir. Numune hazırlamadan gelebilecek hataları gösteren bir kesinlik parametresidir (ICH-Q2(R1), 2005).

Klindamisin fosfatın PBS ve % 0,3 PVA çözeltisi içindeki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için; 5 µg/mL, 40 µg/mL, 100 µg/mL derişimlerde altı farklı çözelti hazırlanmış ve bu çözeltilerin HPLC analizleri yapılarak derişimlere karşılık gelen alan değerleri ve pratik derişimleri bulunmuştur. Pratik derişimlerden hareketle her derişim için ortalama, SS ve % BSS bulunmuştur.

Ara kesinlik; farklı günler, farklı analistler, farklı donanım gibi laboratuvar içi farklılıkları belirtir. Bu etkilerin her birinin incelenmesinin gerekli olmadığı durumlar kılavuzda belirtilmiştir (ICH-Q2(R1), 2005).

Klindamisin fosfatın PBS ve % 0,3 PVA çözeltisindeki miktar tayini yönteminin ara kesinliğinin belirlenebilmesi için; 5 µg/mL, 40 µg/mL, 100 µg/mL derişimlerde altı farklı çözelti hazırlanmış ve bu çözeltilerin birbirini takip eden üç farklı günde HPLC analizleri yapılarak derişimlere karşılık gelen alan değerleri ve pratik derişimleri bulunmuştur. Pratik derişimlerden hareketle her derişim için ortalama, SS ve % BSS değerleri bulunmuştur.

Tekrar elde edilebilirlik; laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (ICH-Q2(R1), 2005). Bu çalışmada tekrar elde edilebilirlik testi gerçekleştirilmemiştir.

2.2.3.3. Seçicilik

Seçicilik, analiz edilen maddeyi diğer bileşenler varlığında tayin edebilme özelliğidir (ICH-Q2(R1), 2005). Seçicilik testi için formülasyonda kullanılan maddelerin ve etken maddenin HPLC ile analizinde girişim olup olmadığına bakılmıştır.

2.2.3.4. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Teşhis sınırı (LOD); belirli koşullar altında örnek içinde analiz edilen maddenin teşhis edilebilen fakat tayin edilemeyen en düşük derişimdir (ICH-Q2(R1), 2005).

$$LOD = 3,3 \sigma/s$$

Eşitlik 2.1

σ: Regresyon doğrularının y eksenini kesen noktalarının standart sapması

s: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Tayin sınırı (LOQ); örnekteki analiz edilen maddenin kabul edilebilir, doğruluk ve kesinlikte kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük miktarıdır (ICH-Q2(R1), 2005).

$$LOQ = 10 \sigma/s$$

Eşitlik 2.2

σ : Regresyon doğrularının y eksenini kesen noktalarının standart sapması

s: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

2.2.3.5. Doğrusallık

Verilen bir aralıkta örnek içindeki analiz edilen maddenin derişimiyle doğrudan orantılı olan test sonuçlarının elde edilebilmesidir. Eğer lineer bir ilişki varsa, test sonuçları, en küçük kareler yöntemiyle regresyon doğrusunun hesaplanması gibi uygun istatistiksel metotlarla değerlendirilebilir. Korelasyon katsayısı, kesişim, regresyon doğrusunun eğimi, artık kareler toplamı hesaplanmalıdır. Ek olarak regresyon doğrusundan gerçek veri noktalarının sapma analizi doğrusallığı hesaplamak için yararlı olabilir. Doğrusallığın saptanmasında en az beş derişim gereklidir (ICH-Q2(R1), 2005).

Uygulama aralığı ise örnek içindeki analiz edilen madde için analitik yöntemin uygun kesinlik, doğruluk, ve doğrusallığa sahip olduğunun gösterildiği en düşük ve en yüksek derişimleri arasındaki aralıktır (ICH-Q2(R1), 2005).

Klindamisin fosfatın PBS ve % 0,3 PVA çözeltisi içindeki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenebilmesi için 2µg/mL ile 200µg/mL aralığında dokuz farklı derişimde çözeltileri hazırlanmış ve hazırlanan derişimlere karşılık gelen alan değerleri GraphPad InStat (Version 3.10) İstatistik Programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.2.4. Film Formülasyonlarının Hazırlanması ve Özelliklerinin İncelenmesi

Çalışma kapsamında incelenen literatürlerden elde edilen bilgiler ışığında, en uygun film formülasyonunun geliştirilmesi için kullanılacak etken madde ve polimerlerin özellikleri dikkate alınarak çeşitli ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için kitozan filmler, aljinat filmler ve aljinat-kitozan kompleks filmler hazırlanmıştır.

2.2.4.1. Kitozan Film Formülasyonlarının Hazırlanması

Kitozan filmler için, % 1, % 1,5 ve % 2 (h/h) asetik asitin sulu çözeltisi içerisinde farklı derişimlerde, düşük moleköl ağırlıklı (LC), orta moleköl ağırlıklı (MC) ve yüksek moleköl ağırlıklı (HC) kitozan çözeltileri hazırlanmıştır (Hermans ve ark., 2014; Kalaycioglu ve ark., 2017; Nesic ve ark., 2017). Çözeltiler süzölmüş ve gerekli miktarda klindamisin fosfat (KF) polimer çözeltilisine ilave edilerek karıştırılmıştır. En son olarak plastizer amacıyla kullanılan propilen glikol (PG) (% 5 h/h) bu karışıma ilave edilerek oda sıcaklığında ağızı kapalı şekilde bir gece (12 saat) karışması sağlanmıştır. Karışım daha sonra ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek hava kabarcıklarından kurtarılmıştır. En son olarak hazır haldeki jel 5 cm çaplı cam petri kaplarına aktarılarak su düzeç ayarı ile düzgünlüğü kontrol edilmiş zeminde oda sıcaklığında çözücü ortamın uzaklaşması için bekletilmiştir. Kuruyan filmler hava geçirmeyecek şekilde, alüminyum folyoya sarılarak plastik kutular içerisinde desikatörde muhafaza edilmiştir.

Öncelikle farklı moleköl ağırlıklı kitozanların hangi asetik asit yüzdesinde daha iyi çözündüğünü saptamak amacıyla formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 2.2). Bu formülasyonlarda etken madde ve plastizer kullanılmamıştır. İlk aşamada sadece çözünmese daha zor olan ve zaman alan orta (MC) ve yüksek moleköl ağırlıklı kitozan (HC) ile deneme yapılmıştır.

Çizelge 2. 2. Etken madde ve plastizer içermeyen film formülasyonları

Formülasyon içeriği	C1	C2	C3	C4	C5	C6
MC (% 1)	0,2 g	0,2 g	0,2 g	-	-	-
HC (% 1)	-	-	-	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Propilen glikol (PG)	-	-	-	-	-	-
Klindamisin fosfat (KF)	-	-	-	-	-	-
Asetik asit (20 mL)	% 1	% 1,5	% 2	% 1	% 1,5	% 2

*MC orta molekül ağırlıklı kitozan, HC yüksek molekül ağırlıklı kitozan

Üç farklı molekül ağırlıklı kitozan ile film formülasyonları hazırlanmış ve bu formülasyonlar ile kitozanın molekül ağırlığının, derişiminin ve asetik asit yüzdesinin etken maddenin *in vitro* salım hızını nasıl etkilediği incelenmiştir (Çizelge 2.3 - Çizelge 2.5).

Çizelge 2. 3. Farklı asetik asit yüzdesi ve farklı molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanmış film formülasyonları

Formülasyon içeriği	C7	C8	C9	C10	C11	C12
MC* (% 1)	0,2 g	0,2 g	0,2 g	-	-	-
HC* (% 1)	-	-	-	0,2 g	0,2 g	0,2 g
PG (% 5)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
KF (% 1)	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Asetik asit (20 mL)	% 1	% 1,5	% 2	% 1	% 1,5	% 2

*MC orta molekül ağırlıklı kitozan, HC yüksek molekül ağırlıklı kitozan

Orta molekül ağırlıklı kitozanın oranı değiştirilerek film formülasyonları hazırlanmıştır. Bu film formülasyonları ile polimer oranının, etken maddenin *in vitro* salım hızını nasıl etkilediği analiz edilmiştir (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2. 4. Orta molekül ağırlıklı kitozanın artan miktarı ile hazırlanan formülasyonlar

Formülasyon içeriği	C8	C13	C14
MC*	0,2 g (% 1)	0,4 g (% 2)	0,6g (% 3)
PG (% 5)	1 mL	1 mL	1 mL
KF (% 1)	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Asetik asit (20 mL)	% 1,5	% 1,5	% 1,5

*MC orta molekül ağırlıklı kitozan

Çizelge 2.5'te gösterilmiş olan C15, C16, C14 formülasyonlarında düşük molekül ağırlıklı kitozanın oranı değiştirilerek film formülasyonları hazırlanmıştır. Bu

film formülasyonları ile polimer oranının etken maddenin *in vitro* salım hızını nasıl etkilediği analiz edilmiştir.

Çizelge 2. 5. Düşük molekül ağırlıklı kitozanın artan miktarı ile hazırlanan formülasyonlar

Formülasyon içeriği	C15	C16	C17
LC*	0,2 g (% 1)	0,4 g (% 2)	0,6 g (% 3)
PG (% 5)	1 mL	1 mL	1 mL
KF (% 1)	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Asetik asit (20 mL)	% 1,5	% 1,5	% 1,5

*LC düşük molekül ağırlıklı kitozan

2.2.4.2. Aljinat Film Formülasyonlarının Hazırlanması

Aljinat filmler için, aljinatın farklı derişimlerde sulu çözeltileri hazırlanmış daha sonra içerisine gerekli miktarda KF ve PG eklenmiştir (Crossingham ve ark., 2014; Ng ve Tan, 2015). Karışım ağzı kapalı bir şekilde oda sıcaklığında 12 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışım daha sonra ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek hava kabarcıklarından kurtarılmıştır. En son olarak hazır haldeki jel 5 cm çaplı cam petri kaplarına aktararak su düzeç ayarı ile düzgünlüğü kontrol edilmiş zeminde oda sıcaklığında çözücü ortamın uzaklaşması için bekletilmiştir. Kuruyan filmler hava geçirmeyecek şekilde, plastik kutular içerisinde desikatörde muhafaza edilmiştir.

Öncelikle etken madde ve plastizer içermeyen aljinat film (A1) hazırlanmış ve yapısı incelenmiştir. Formülasyon içeriğinde PG olmadığına yapının fazla sert ve kırılğan olduğu görülmüştür. Daha sonra iki farklı viskoziteli aljinat ile derişim değiştirilerek filmler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu filmler ile viskozite farklılığı ve artan polimer miktarının *in vitro* salım hızını nasıl etkilediği incelenebilmiştir (Çizelge 2.6 ve Çizelge 2.7).

Çizelge 2. 6. Düşük viskoziteli (250 cPs) aljinatın artan miktarı ile hazırlanan formülasyonlar

Formülasyon içeriği	A1	A2	A3	A4	A5
Aljinat (Düşük viskoziteli)	0,2 g (% 1)	0,2 g (% 1)	0,4 g (% 2)	0,6 g (% 3)	0,8 g (% 4)
PG (% 5)	-	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
KF (% 1)	-	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Distile su	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL

Çizelge 2. 7. Orta viskoziteli (≥ 2000 cPs) aljinatın artan miktarı ile hazırlanan formülasyonlar

Formülasyon içeriği	A6	A7	A8	A9
Aljinat (Orta viskoziteli)	0,2 g (% 1)	0,4 g (% 2)	0,6 g (% 3)	0,8 g (% 4)
PG (%5)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
KF (%1)	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Distile su	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL

2.2.4.3. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarının Hazırlanması

Aljinat-kitozan kompleks filmler farklı derişimlerde hazırlanmış olan orta ve düşük moleköl ağırlıklı kitozan ve orta viskoziteli aljinat çözeltilerinin belirli oranlarda karıştırılması ile elde edilmiştir (Venkatesan ve ark., 2017). Yapılan ilk formülasyon denemelerinde etken madde ve plastizer kullanılmadan en uygun oran ve yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. AC1 ve AC2 formülasyonlarında çapraz bağlayıcı olarak kullanılan kalsiyum klorür (CaCl_2) farklı derişimlerdeki çözeltisi halinde formüle ilave edilmiştir. Bu yöntem ile homojen film yapısı oluşturulamamış ve CaCl_2 'nin kitozan çözeltisi içerisinde, oluşan son hacmin (20 mL) %1'i olacak şekilde formülasyonlara ilave edilmesine karar verilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda en uygun karıştırma yönteminin de aljinat çözeltisi üzerine kitozan çözeltisi ilavesi sırasında prob sonikatörde (Bandelin, Almanya) karıştırma yapılması ve sonrasında 10 dakika Ultra turrax® homojenizatör (IKA, Almanya) ile karışımın homojen hale getirilmesi şeklinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2.8 ve Çizelge 2.9).

Çizelge 2. 8. Klindamisin fosfat içermeyen sadece prob sonikatör kullanılarak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları

Formülasyon içeriği*	AC1	AC2	AC3	AC4	AC5
Aljinat	(% 0,1) 10 mL	(% 0,2) 10 mL	(% 0,5) 10 mL	(% 0,5) 10 mL	(% 0,5) 10 mL
MC	(% 0,5) 5 mL	(% 0,5) 5 mL	(% 0,5) 10 mL	(% 0,5) 10 mL	(% 0,5) 10 mL
PG (% 5)	-	-	-	1 mL	1 mL
Karıştırma sırası	Aljinat üzerine kitozan	Aljinat üzerine kitozan	Aljinat üzerine kitozan	Aljinat üzerine kitozan	Kitozan üzerine aljinat

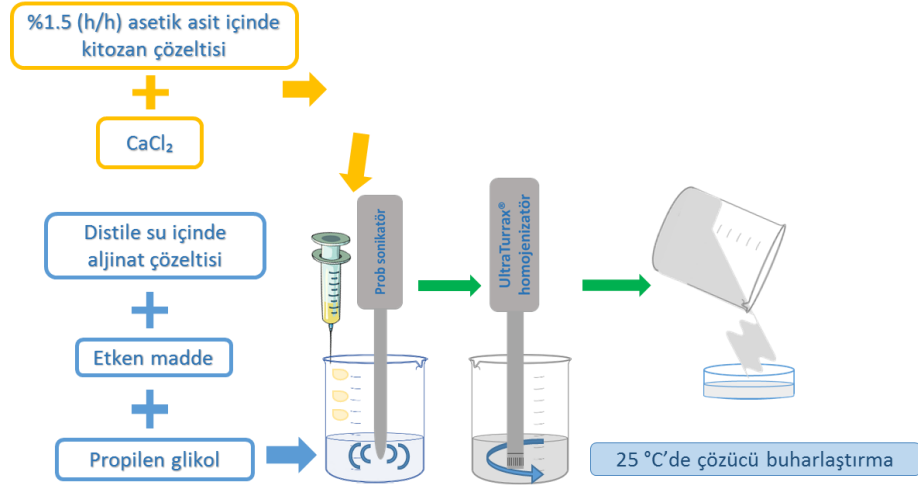
*Formülasyonlarda % 0,1 CaCl₂ kullanılmıştır.

Çizelge 2. 9. Klindamisin fosfat içermeyen prob sonikatör sonrasında UltraTurrax kullanılarak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları

Formülasyon içeriği*	AC6	AC7	AC8	AC9
Aljinat	(% 0,5) 10 mL	(% 0,5) 10 mL	(% 1) 10 mL	(% 1) 10 mL
MC	(% 0,5) 10 mL	(% 0,5) 10 mL	(% 1) 10 mL	(% 1) 10 mL
PG (% 5)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Karıştırma sırası	Aljinat üzerine kitozan	Kitozan üzerine aljinat	Aljinat üzerine kitozan	Kitozan üzerine aljinat

*Formülasyonlarda % 0,1 CaCl₂ kullanılmıştır.

Bu ön çalışmadan yola çıkılarak KF içeren kompleks filmler, PG içeren aljinat çözeltisi üzerine damla damla CaCl₂ içeren kitozan çözeltisi ilave edilerek hazırlanmıştır (Şekil 2.3). Bu işlem buz banyosu içinde 30 dakika boyunca, 9 siklus, % 35 güç ayarında prob sonikatör ile karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karışım 8000 rpm de Ultra turrax® homojenizatör ile 5 dakika karıştırılmıştır. Oluşan karışım 5 cm çaplı petri kabına dökülmüş ve çözücü ortam oda sıcaklığında bekletilerek uzaklaştırılmıştır. Kuruyan filmler hava geçirmeyecek şekilde, plastik kutular içerisinde desikatörde muhafaza edilmiştir.



Şekil 2. 3. Aljinat-kitozan kompleks film formülasyonlarının hazırlanışının şematik gösterimi

Karıştırma işlemleri farklı hacimdeki polimer çözeltileri ile denenmiş ve en homojen film yapısı 15 mL ve 5 mL hacimlerdeki polimer çözeltilerinin karıştırılmasıyla elde edilmiştir (Çizelge 2.10. ve Çizelge 2.11.). Bu hacim değerleri farklı derişimlerdeki kitozan ve aljinat çözeltileri için ayrı ayrı denenmiştir (Çizelge 2.11., Çizelge 2.12., Çizelge 2.13).

Çizelge 2. 10. Klindamisin fosfat içeren ve eşit hacimde polimer çözeltileri ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları

Formülasyon içeriği*	AC10	AC11	AC12	AC13
Aljinat (10 mL)	% 0,5	% 0,5	% 1	% 1
MC (10 mL)	% 0,5	-	% 1	-
LC (10 mL)	-	% 0,5	-	% 1

*Formülasyonlarda %0,1 CaCl₂, 1 mL PG ve 0,2 g KF kullanılmıştır.

Çizelge 2. 11. Yüksek hacimde kitozan çözeltileri kullanılarak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları

Formülasyon içeriği*	AC14	AC15	AC16	AC17	AC18	AC19
Aljinat (5 mL)	% 1	% 2	% 3	% 1	% 2	% 3
MC (15 mL)	% 1	% 2	% 3	-	-	-
LC (15 mL)	-	-	-	% 1	% 2	% 3

*Formülasyonlarda %0,1 CaCl₂, 1 mL PG ve 0,2 g KF kullanılmıştır.

Çizelge 2. 12. Yüksek hacimde aljinat çözeltisi kullanılarak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları

Formülasyon içeriği	AC20	AC21	AC22	AC23	AC24	AC25
Aljinat (15 mL)	% 1	% 2	% 3	% 1	% 2	% 3
MC (5 mL)	% 1	% 2	% 3	-	-	-
LC (5 mL)	-	-	-	% 1	% 2	% 3

*Formülasyonlarda %0,1 CaCl₂, 1 mL PG ve 0,2 g KF kullanılmıştır.

Çizelge 2. 13. Kitozan çözeltisi derişimi sabit tutularak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları

Formülasyon içeriği	AC26	AC27	AC28	AC29	AC30	AC31	AC32	AC33
Aljinat	(% 2) 5 mL	(% 3) 5 mL	(% 2) 15 mL	(% 3) 15 mL	(% 2) 5 mL	(% 3) 5 mL	(% 2) 15 mL	(% 3) 15 mL
MC	(% 1) 15 mL	(% 1) 15 mL	(% 1) 5 mL	(% 1) 5 mL	-	-	-	-
LC	-	-	-	-	(% 1) 15 mL	(% 1) 15 mL	(% 1) 5 mL	(% 1) 5 mL

*Formülasyonlarda %0,1 CaCl₂, 1 mL PG ve 0,2 g KF kullanılmıştır.

Çizelge 2. 14. Sodyum aljinat çözeltisi derişimi sabit tutularak hazırlanan aljinat-kitozan kompleks film formülasyonları

Formülasyon içeriği	AC34	AC35	AC36	AC37	AC38	AC39	AC40	AC41
Aljinat	(% 1) 5 mL	(% 1) 5 mL	(% 1) 15 mL	(% 1) 15 mL	(% 1) 5 mL	(% 1) 5 mL	(% 1) 15 mL	(% 1) 15 mL
MC	(% 2) 15 mL	(% 3) 15 mL	(% 2) 5 mL	(% 3) 5 mL	-	-	-	-
LC	-	-	-	-	(% 2) 15 mL	(% 3) 15 mL	(% 2) 5 mL	(% 3) 5 mL

*Formülasyonlarda %0,1 CaCl₂, 1 mL PG ve 0,2 g KF kullanılmıştır.

2.2.4.3.1. Kompleks Film Formülasyonlarında Etken Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin İncelenmesi

2.2.4.3.1.1. Ayrımsal Taramalı Kalorimetri Analizi

Film formülasyonlarında polimerlerin ve etken maddenin ayrı ayrı ve birlikte iken göstermiş oldukları termal özellikler DSC (DSC-60, Shimadzu) ile incelenmiştir. Bu amaçla yaklaşık 3 mg ağırlığındaki kompleks film, tek başına klindamisin fosfat, tek başına aljinat ve tek başına kitozan alüminyum pan içerisine sıkıştırılarak

kapatılmıştır. Numuneler 50 mL/dakika azot gazı akışı altında 30-300 °C sıcaklık aralığında 5 °C/dakika hızla ısıtılmış ve DSC termogramları alınmıştır.

2.2.4.3.1.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) Analizleri

Klindamisin fosfat, toz haldeki aljinat ve kitozan ve aljinat-kitozan kompleks filmin FTIR spektrumları oda sıcaklığında KBr disk yöntemi kullanılarak Shimadzu FTIR-8040 (Japonya) spektrometre ile alınmıştır. Spektrumlar 400–4000 cm^{-1} aralığında, 16 cm^{-1} çözünürlükte ve 30 taramayla alınmıştır.

2.2.4.4. Film Formülasyonlarının Döküm Öncesi Viskozluk Tayini

Tasarlanmış olan farklı film formülasyonlarının kurumaya bırakılmadan önce Brookfield viskozimetre/ RVTDV-2 (ABD) ve Brookfield viskozimetre/LVDV-I Prime (SSAIY/GR) (Small sample adapter) ile viskozite ölçümleri yapılmıştır. RVTDV-2 viskozimetre için farklı spindle türleri denenmiş ve tüm formülasyonlar için en uygun olanın T spindle-No:93 olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca ölçümler 5, 10, 15 ve 20 rpm dönü hızında gerçekleştirilmiş ve tekrarlanabilir sonuçlar 20 rpm ile elde edilmiştir. Ölçümler 25 ± 1 °C'de her formülasyon için üç defa tekrarlanmış ve ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

2.2.4.5. Filmlerde Kalınlık ve Ağırlık Tayini

Kurumuş olan herbir film formülasyonunun farklı bölgelerinden 3,5 mm çapında kesitler alınarak her kesit için kalınlık (NSK Micrometer, Japonya) ve ağırlık (Sartorius BL 210S, Almanya) ölçümleri yapılmış ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır ($n=6$).

2.2.4.6. Filmlerde İşlem Etkinliği Tayini

Elde edilen her bir filmde 3,5 mm çapında altı kesit alınmış ayrı ayrı tartıldıktan sonra her kesit 50 mL'lik balon jöjelere konulmuştur. PBS ile 50 mL'ye tamamlanarak manyetik karıştırıcı (Daihan, Güney Kore) yardımı ile filmin tamamı çözünene kadar karıştırılmıştır. Elde edilen bu çözeltiden alınan numuneler HPLC yöntemi ile analiz edilmiş etken maddenin tampon ortamındaki kalibrasyon doğru denklemi yardımı ile derişimler hesaplanmıştır. Sonuçlar % işlem etkinliği şeklinde verilmiş olup hesaplanması Eşitlik 2.3 ve Eşitlik 2.4 ile gösterilmiştir.

$$\text{Teorik etken madde miktarı (mg)} = \frac{\text{Film kesitinin ağırlığı (mg)} \times \text{Formülasyondaki etken madde miktarı (mg)}}{\text{Tüm filmin ağırlığı (mg)}}$$

Eşitlik 2.3.

$$\% \text{İşlem etkinliği} = \frac{\text{Film kesitindeki etken madde miktarı}}{\text{Film kesitindeki teorik etken madde miktarı}} \times 100$$

Eşitlik 2.4.

Elde edilen % işlem etkinliği verilerinden hareketle *in vitro* çözünme hızı deneylerinde kullanılan film kesitlerindeki etken madde miktarları ayrı ayrı hesaplanmış ve bu değer başlangıç (t=0 anındaki) etken madde miktarı olarak kullanılmıştır.

2.2.4.7. Filmlerde *In vitro* Çözünme Hızı Tayini

Filmlerden etken madde çözünme hızını değerlendirmek amacıyla dializ membran yöntemi kullanılmıştır. Her bir formülasyon için üç paralel çalışılmıştır. Deneylerde çözünme ortamı olarak pH 6,75 fosfat tamponu seçilmiştir.

Dializ membran yöntemi ile yürütülen deney sırasında ağzı kapaklı kavanozların içine önceden 37 °C'ye getirilmiş 50 mL tampon konulmuştur. Bir gün önceden tampon ile ıslatılarak porları açılmış 8 cm boyundaki membranların (Molecular weight cut off :14000) içerisine 1 adet 3,5 mm çaplı film ve 1 mL tampon konulmuş, membranın iki ucu sızma olmayacak şekilde klipslerle kapatılmış ve kavanozlardaki tamponun içine daldırılmıştır. Kavanozların kapakları kapatılarak 37 °C sıcaklığa ve 75 rpm'e ayarlanmış çalkalayıcı içerisine yerleştirilmiştir. Çözünme ortamından belirlenen zaman aralıklarında 1 mL'lik numuneler çekilmiş ve ortama eksilen miktar kadar aynı sıcaklıktaki tampondan ilave edilmiştir. Her numunenin HPLC ile analizi yapılmış ve belirlenmiş zaman aralıklarında açığa çıkan madde miktarı tayin edilmiştir. Çözünme hızı verileri zamana karşı açığa çıkan % kümülatif etken madde miktarı ile grafiklendirilerek, salım profilleri açısından karşılaştırılmıştır ($n=3$).

2.2.4.8. Film Formülasyonlarının *In vitro* Şişme Özelliklerinin İncelenmesi

Film formülasyonlarının şişme özelliklerinin incelenebilmesi için 3,5 mm çapındaki filmler tartılmış ve daha sonra PBS içerisinde bekletilmiştir. *In vitro* çözünme hızı ile aynı zaman aralıklarında, filmler tampon ortamından alınıp fazla suyu alındıktan sonra tekrar tartılmıştır ($n=3$). % Şişme derecesi Eşitlik 2.5 kullanılarak hesaplanmıştır;

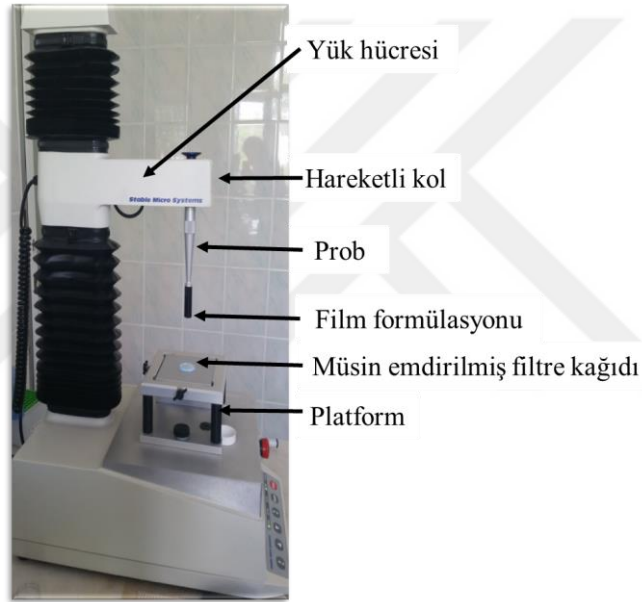
$$\% \text{ Şişme derecesi} = \frac{\text{Filmin } t \text{ anındaki ağırlığı} - \text{Filmin ilk ağırlığı}}{\text{Filmin ilk ağırlığı}} \times 100$$

Eşitlik 2.5.

2.2.4.9. Film Formülasyonlarının *In vitro* Adezif Özelliklerinin İncelenmesi

Kompleks film formülasyonlarının adeziflikleri tekstür analiz cihazı ile (TA.XT plus, Stable Micro Systems, Birleşik Krallık) incelenmiştir. Test için kompleks filmlerden 1 cm² alana sahip dairesel kesitler alınıp çift taraflı bant yardımı ile yük hücreğine bağlı bulunan probun (P/0,5R) ucuna sabitlenmiştir. Cihazın alt kısmında

bulunan tablaya hamur bant (Tack-It,Faber-Castell,Germany) yardımıyla % 10 müsün ile ıslatılmış filtre kağıdı sabitlenmiştir (Şekil 2.4). Adhezif modda bulunan cihaz ile belirli bir kuvvet uygulanarak belirli süre numune ile müsünün temas etmesi sağlanmış ve süre sonunda filmin müsünden belirli hızda ayrılması için gerekli olan kuvvet ve yapılan adezyon işi sırasında analiz programının çizdiği grafikte pik noktası ve eğri altında kalan alan ile bulunmuştur (Kilicarslan ve ark., 2018; Kilicarslan ve ark., 2014c; Morales ve ark., 2014). İşlem her formülasyon için farklı numuneler kullanılarak üç kez tekrarlanmıştır. Test ile ilgili parametreler Çizelge 2.15 ile gösterilmiştir.



Şekil 2. 4. TA-XT Plus tekstür analiz cihazında film formülasyonunun yerleşimi

Çizelge 2. 15. Adezyon testi koşulları

Parametre	Koşul
Prob	12 mm çap
Test tipi	Adezyon
Test öncesi probun hızı	0,5 mm/saniye
Test esnasında probun hızı	0,5 mm/saniye
Test sonrası probun hızı	0,5 mm/saniye
Numune ve müsünün temas süresi	60 saniye
Probun müsünden uzaklaşma mesafesi	10,0 mm
Teste başlamak için probun algılaması gereken kuvvet	0,05 N

2.2.4.10. Film Formülasyonlarının Görüntülenmesi

2.2.4.10.1. Optik Mikroskop

Optik mikroskop (Leica, Almanya) ile tüm formülasyonların genel görünüm ve film homojenliği kontrol edilmiştir (Büyütme oranları: x4, x10, x40).

2.2.4.10.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Özelliklerinin İncelenmesi

Seçilen formüllerde taramalı elektron mikroskobu (Quanta 400F SEM, FEI, Almanya) kullanılarak oluşturulmuş olan filmler ve film içinde oluşan kompleks yapı görüntülenmiştir. Bu amaçla cihaz 15 kV hızlanma voltajında çalıştırılmıştır. Tüm örnekler iletken altın ile kaplandıktan (Gatan 682 PECS, ABD) sonra mikroskop altında incelenmiştir.

2.2.4.10.3. Mikro-BT

Formülasyonların üç boyutlu mikro yapısı mikro-BT ile analiz edilmiştir (Kilicarslan ve ark., 2018). Bu amaçla, kompleks film formülasyonlarını taramak için yüksek çözünürlüklü masaüstü Mikro-BT sistemi (Bruker Skyscan 1275, Kontich, Belçika) kullanılmıştır (Şekil 2.5). Halka artefaktlarını en aza indirmek için, her taramadan önce dedektörün hava kalibrasyonu yapılmıştır. Tarama koşulları Çizelge 2.16 ile gösterilmiştir.



Şekil 2. 5. Bruker SkyScan 1275 Mikro-BT

Çizelge 2. 16. Mikro-BT ile film formülasyonlarının tarama koşulları

Parametre	Tarama koşulu
Tüp voltajı	100 kVp
Işın akımı	100 μ A
Filtre	0,5 mm Al / Cu filtre
Piksel boyutu	4,2 μ m
Döndürme	0,2 adım, 360°

Numunenin görselleştirilmesi ve nicel ölçümlerinde, eksenel, iki boyutlu (2D) ve 1000×1000 piksel görüntüler elde etmek için Feldkamp ve ark. (1989) tarafından tarif edilmiş algoritmanın modifiye halini kullanan NRecon yazılımı (ver. 1.6.10.4, SkyScan, Kontich, Belçika) ve CTAn (ver. 1.16.1.0, SkyScan, Belçika) kullanılmıştır (Feldkamp ve ark., 1989). Yeniden yapılanma parametreleri için, halka artefaktı düzeltilmesi ve düzleştirme sifıra sabitlenmiştir. Işın artefaktı düzeltilmesi % 40' a ayarlanmıştır. NRecon yazılımı (SkyScan, Kontich, Belçika) kullanılarak, tarayıcı tarafından elde edilen görüntüler, filmlerin iki boyutlu kesitlerini göstermek için yeniden yapılandırılmıştır. Tüm hacimden elde edilen toplam 1023 kesit görüntüsü mikro-BT'de yeniden oluşturulmuştur. Ayrıca, filmlerin üç boyutlu hacimsel görselleştirilmesi ve analizi için CTAn (SkyScan, Aartselaar, Belçika) yazılımı kullanılmıştır. Tüm rekonstrüksiyonlar, 21,3 inç düz panel renkli aktif matris TFT medikal ekran (NEC MultiSync MD215MG, Münih, Almanya) üzerinde, 75 Hz'de 2048 - 2560 ve 11,9 bit hızında 0,17 mm nokta aralığında gerçekleştirilmiştir.

Yeniden yapılanmadan sonra, numunenin 3 boyutlu mikro yapısını analiz etmek için programın tüm özelliklerinin kullanıldığı CTAn yazılımı kullanılarak, numunenin tamamını içerecek şekilde ilgi bölgesi (ROI) çizilmiştir.

İlaç yüklü koaservatları tüm film numunesinden ayırt etmek için uygun bir eşik gerekmiştir. Bu nedenle, eşğin alt sınırı 0 ile 255 arasında (gri değerlerde), üst sınırı ise en yüksek yoğunluk değerini temsil eden parlaklık spektrumunun üst ucunda olacak şekilde ayarlanmıştır. Koaservatların hacim ve yarıçaplarının üç boyutlu olarak hesaplanabilmesi için, orijinal gri tonlamalı görüntüler gürültünün azaltılması için Gauss alçak geçiren filtre ile işlenmiştir ve otomatik bir segmentasyon eşği kullanılmıştır. Yalnızca siyah / beyaz piksellerden oluşan bir görüntü elde etmek için gri seviyelerinin işlenmesini gerektiren bir eşiklendirme işlemi kullanılmıştır. Daha sonra, her kesit için ayrı olarak, hacimlerin hesaplanmasını sağlayacak bir ROI seçilmiştir.

Her numunede 4 yapısal parametre analiz edilmiştir;

1. Toplam hacim (TV), tüm film numunesini;
2. Nesne hacmi (Obj.V), ilaç yüklü koaservat hacmini;
3. Obj.V / TV (%), analiz edilen toplam film hacmine göre toplam koaservat miktarını ve;
4. Yapısal model endeksi (SMI), değerlendirilen yapının plaka benzeri veya çubuk benzeri şeklinin göreceli varlığını ifade etmektedir. SMI 0 ile 4 arasında tanımlanır ve 0'a yakın değer ideal plakaya, 3'e yakın değer ise ideal bir silindire ve 4'e yakın değer küresel yapıya karşılık gelir. Ayrıca film içerisinde oluşan koaservatların çapı da ölçülmüştür.

2.2.5. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Özelliklerinin İncelenmesi

Çalışma kapsamında incelenen literatürlerden elde edilen bilgiler ışığında, en uygun nanopartikül formülasyonunun geliştirilmesi için kullanılacak etken madde ve polimerlerin özellikleri dikkate alınarak çeşitli ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için farklı molekül ağırlığına sahip PLGA kullanılmış, farklı derişimlerde hazırlanmış PVA çözeltileri farklı hazırlama yöntemleri ile formülasyonlara ilave edilmiş ve çeşitli formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyonların özelliklerinin incelenmesi sonucunda da klindamisin fosfat ve BMP yüklü en uygun nanopartikül

formülasyonu seçilerek nanopartikül-film kombinasyonu ve nanopartikül-greft kombinasyonu hazırlanmıştır.

2.2.5.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartikül formülasyonları için emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmış su/yağ/su çoklu emülsiyon oluşturularak çalışılmıştır (Colzani ve ark., 2016; Yilgor ve ark., 2010). Bunun için yağ fazı olarak 100 mg PLGA 1 mL DCM içinde çözülmüştür. 20 mg klindamisin fosfat veya 4 µg BMP 1 mL distile su içinde çözülmüştür (Su 1). Su 1 fazı buz banyosu içerisindeki yağ fazı içine enjektör yardımı ile (26G insülin iğnesi) ilave edilerek % 38 güçteki prob sonikatörde bir dakika boyunca homojenize edilmiştir. Oluşan s/y emülsiyonu buz banyosundaki 20 mL PVA çözeltisi içerisine UltraTurrax homojenizatörde karıştırılacak şekilde iken hızlıca ilave edilmiştir. Beş dakika 8500 rpm’de homojenize olması sağlanmıştır. Oluşan S/Y/S emülsiyonu DCM tamamen uzaklaşana kadar çeker ocak altında manyetik karıştırıcıda 500 rpm de 3 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra 20000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir (Sigma 3-30 KS, Almanya). Partiküller ultra saf su ile iki defa yıkanmış ve 20000 rpm de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatan kısmı toplanarak yükleme etkinliği analizlerinde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Elde edilen partiküller dondurulduktan sonra 1 gece liyofilize edilmiştir (Christ Gamma 2-15 LSC, Almanya).

Nanopartikül formülasyon çalışmalarında öncelikle farklı derişimdeki PVA çözeltileri kullanılmıştır (Çizelge 2.17, Çizelge 2.18 ve Çizelge 2.19).

Çizelge 2. 17. % 1, % 3 ve % 0,1 (a/h) PVA çözeltisi ile hazırlanmış nanopartiküller

PLGA tipi		24-38 kDa, 50:50, ester					
Fazlar	Formülasyon	N1	N2	N2-2*	N3	N4**	N5
Su 1	KF (mg)	20	20	20	20	20	20
	Dist. Su (mL)	1	1	1	1	1	-
	PBS (pH:6)	-	-	-	-	-	1
Yağ	PLGA (mg)	100	100	100	100	100	100
	DCM (mL)	1	1	1	1	1	1
Su 2	PVA (20 mL)	% 1	% 3	2 mL % 3	% 0,1	% 0,1	% 0,1

*2 mL % 3 PVA çözeltisi ile hazırlanıp daha sonraki karıştırmada 20 mL'ye seyreltilmiştir.

** İlk su 1 /yağ emülsiyonu dondurulmuştur.

Çizelge 2. 18. % 0,2 (a/h) PVA çözeltisi ile hazırlanmış nanopartiküller

PLGA tipi		24-38 kDa, 50:50, ester	7-17 kDa, 50:50, ester	7-17 kDa, 50:50, asit	76-115 kDa, 75:25, ester	
Fazlar	Formülasyon	N6	N7*	N8	N9	N10
Su 1	KF (mg)	20	20	20	20	20
	Dist. Su (mL)	1	1	1	1	1
Yağ	PLGA (mg)	100	100	100	100	100
	DCM (mL)	1	1	1	1	1
Su 2	PVA (20 mL)	% 0,2	% 0,2	% 0,2	% 0,2	% 0,2

* Su 1 /yağ emülsiyonunun su 2 fazına ilavesinden sonra UltraTurrax ile beş dakika boyunca 24000 rpm'de karıştırılmıştır.

Çizelge 2. 19. % 0,3 (a/h) PVA çözeltisi ile hazırlanmış nanopartiküller

PLGA / Polimer tipi		24-38 kDa, 50:50, ester	76-115 kDa, 75:25, ester	PCL		
Fazlar	Formülasyon	N11	N12	N13*	N14	N15
Su 1	KF (mg)	20	20	20	20	20
	Dist. Su (mL)	1	0,5	1	1	1
Yağ	PLGA (mg)	100	100	100	100	-
	PCL (mg)	-	-	-	-	100
	DCM (mL)	1	1	1	1	1
Su 2	PVA (20 mL)	% 0,3	% 0,3	% 0,3	% 0,3	% 0,3

*Su 1/yağ emülsiyonunda da ultraturax kullanılmıştır.

Bu aşamadan sonra ana formülasyon olarak N11 seçilmiş ve formülasyon üzerindeki değişiklikler bu formülasyona göre gerçekleştirilmiştir. Dış faz pH'sı ve

etken madde miktarı değiştirilerek formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 2.20 ve Çizelge 2.21).

Çizelge 2. 20. Farklı pH değerlerinde % 0,3 (a/h) PVA çözeltisi ile hazırlanmış nanopartiküller

Fazlar	Formülasyon	N11	N16	N17	N18
Su 1	KF (mg)	20	20	20	20
	Dist. Su (mL)	1	1	1	1
Yağ	PLGA (mg)	100	100	100	100
	DCM (mL)	1	1	1	1
Su 2	PVA (20 mL)	% 0,3	% 0,3	% 0,3	% 0,3
Dış su fazı pH değeri		6,95*	4	10	12

*PVA çözeltisinin tamponlanmadan ölçülen pH değeridir.

Çizelge 2. 21. Etken madde miktarının değiştirilmesi ile elde edilmiş nanopartiküller

Fazlar	Formülasyon	N11	N19	N20
Su 1	KF (mg)	20	10	50
	Dist. Su (mL)	1	1	1
Yağ	PLGA (mg)	100	100	100
	DCM (mL)	1	1	1
Su 2	PVA (20 mL)	% 0,3	% 0,3	% 0,3

Formülasyonun yükleme etkinliğini etkileyen parametreyi anlayabilmek için formülasyonu oluşturan iç veya dış faz değiştirilerek formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 2.22 ve Çizelge 2.23).

Çizelge 2. 22. Yağ fazı veya su 1 fazının değiştirilmesi ile elde edilen nanopartiküller

Fazlar	Formülasyon	N21	N22	N23	N24	N25*
Su 1	KF (mg)	20	20	20	20	20
	Dist. Su (mL)	1	1	1	-	-
	% 0,1 PVA (mL)	-	-	-	1	-
	Metanol (mL)	-	-	-	-	1
Yağ	PLGA (mg)	100	100	100	100	100
	DCM (mL)	5	1	-	1	1
	DCM : Aseton(75:25) (mL)	-	1	-	-	-
	DCM : Metanol(75:25) (mL)	-	-	1	-	-
Su 2	PVA (20 mL)	% 0,3	% 0,3	% 0,3	% 0,3	% 0,3

* İç su fazı olarak etken maddenin metanol içerisindeki dispersiyonu kullanılmıştır.

Çizelge 2. 23. Su 2 fazının değiştirilmesi ile elde edilen nanopartiküller

Fazlar	Formülasyon	N26	N27	N28
Su 1	KF (mg)	20	20	20
	Dist. Su (mL)	1	1	-
Yağ	PLGA (mg)	100	100	100
	DCM (mL)	1	1	1
Su 2	% 0,3 PVA (mL)	5	-	-
	Gliserin : % 0,3 PVA (50:50) (mL)	-	20	-
	(PG : Gliserin (50:50)) : % 0,3 PVA (50:50) (mL)	-	-	20

Yükleme etkinliğini değiştirebilmek için formülasyona farklı polimerler eklenerek denemeler yapılmıştır (Çizelge 2.24).

Çizelge 2. 24. Çift polimer tabakalı (s/y/y/s ve s/y/s(kitozan)) nanopartiküller

Fazlar	Formülasyon	N29	N30
Su 1	KF (mg)	20	20
	Dist. Su (mL)	1	1
Yağ 1	PLGA (7-17 kDa, 50:50, ester) (mg)	100	-
	DCM (mL)	1	-
Yağ 2	PLGA (24-38 kDa, 50:50, ester) (mg)	100	100
	DCM (mL)	1	1
Su 2	PVA (% 0,3 (a/h)) (mL)	20	10
	% 0,5 (a/h) kitozan (MC) çözeltisi (mL)	-	10

BMP yüklü nanopartikülleri hazırlamadan önce yüklem ve salım özelliklerini değerlendirebilmek için BSA yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır (Çizelge 2.25). Daha sonra aynı formülasyonlar BMP ile yüklenerek hazırlanmıştır (Çizelge 2.26).

Çizelge 2. 25. BSA ve BSA - klindamisin fosfat yüklü nanopartiküller

Fazlar	Formülasyon	NBSA1	NBSA2	NBSA3	NBSA4
Su 1	KF (mg)	-	20	-	20
	BSA (µg)	1	1	4	4
	Dist. Su (mL)	1	1	1	1
Yağ	PLGA (mg)	100	100	100	100
	DCM	1	1	1	1
Su 2	pH 10 PVA (% 0,3 (a/h))	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL

Çizelge 2. 26. BMP ve BMP - klindamisin fosfat yüklü nanopartiküller

Fazlar	Formülasyon	N31	N32	N33	N34
Su 1	KF (mg)	-	20	-	20
	BMP (µg)	1	1	4	4
	Dist. Su (mL)	1	1	1	1
Yağ	PLGA (mg)	100	100	100	100
	DCM	1	1	1	1
Su 2	pH 10 PVA (% 0,3 (a/h))	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL

2.2.5.2. Nanopartiküllerde Etken Madde - Yardımcı Madde Etkileşiminin İncelenmesi

2.2.5.2.1. Ayrımsal Taramalı Kalorimetri Analizi

Nanopartiküllerde polimerin ve etken maddenin ayrı ayrı ve birlikte iken göstermiş oldukları termal özellikler ayrımsal taramalı kalorimetrik analiz ile incelenmiştir. Bu amaçla yaklaşık 3 mg ağırlığındaki nanopartikül, tek başına KF, tek başına PLGA alüminyum pan içerisine koyulup sıkıştırılarak kapatılmıştır. Örneklerin 50 mL / dakika azot gazı akımı altında, 5 °C / dakika hızda, 30-300°C aralığında DSC termogramı alınmıştır.

2.2.5.3. Nanopartiküllerde Partikül büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Tayini

Nanopartiküllerde partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi tayini için örneklerin liyofilizasyon öncesi ve sonrasında ultra saf su içerisindeki süspansiyonları hazırlanmış ve hazırlanan bu örnekler Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Inst., İngiltere) ile analiz edilmiştir. Altı kez tekrarlanan ölçümlerin ardından ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Hazırlanan formüllerin zeta potansiyel değerlerinin tayini için ise partiküller ultra saf su içerisinde seyreltilmiş ve 1 mL hacmindeki zeta potansiyel ölçüm kuvetine konulmuştur. Örnekler Zetasizer Nano Series (Nano-ZS, Malvern Inst., İngiltere) ile analiz edilmiş, ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır ($n=6$) (Fattahi ve ark., 2016; Mante ve ark., 2016).

2.2.5.4. Nanopartiküllerin % Verim ve % İşlem Etkinliğinin Tayini

Nanopartiküllerin hazırlama aşamasında toplanan süpernatana formülasyon hazırlanırken kullanılan PVA çözeltisi ile gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Süpernatana derişimi klindamisin fosfat için HPLC, bovin serum albumin için BCA kit ve BMP için ELISA kit ile tayin edilmiştir ($n=3$). Elde edilen veriler Eşitlik 2.6'te yerine yazılarak % işlem etkinliği hesaplanmıştır.

Nanopartiküllerin hazırlanmasındaki verim ise liyofilizasyon sonrası elde edilen nanopartikül miktarının kullanılan toplam toz miktarına orantılanması ile hesaplanmıştır (Eşitlik 2.7).

$$\% \text{ İşlem etkinliği} = \frac{\text{Toplam etken madde miktarı} - \text{Süpernatandaki etken madde miktarı}}{\text{Toplam etken madde miktarı}} \times 100$$

Eşitlik 2.6.

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Liyofilize toz miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan toplam etken madde ve polimer miktarı (mg)}} \times 100$$

Eşitlik 2.7.

2.2.5.5. Nanopartiküllerde *In vitro* Çözünme Hızı Tayini

Klindamisin fosfat içeren nanopartiküller için yaklaşık 1 mg etken madde içeren nanopartiküller ependorf tüp içinde tartılmış ve tüp içerisine 1 mL pH 6,75 fosfat tamponu koyulmuştur. Tüpler 37 °C sıcaklığa ve 75 rpm'e ayarlanmış çalkalayıcı içerisine yerleştirilmiştir. Tüpler belirlenen zaman aralıklarında santrijüj edilerek süpernatant alınmış ve aynı miktar ve sıcaklıktaki tampondan ilave edilmiştir. Her numunenin HPLC ile analizi yapılmış ve belirlenmiş zaman aralıklarında açığa çıkan madde miktarı tayin edilmiştir. Çözünme hızı verileri zamana karşı açığa çıkan % kümülatif etken madde miktarı ile grafiklendirilerek, salım profilleri açısından karşılaştırılmıştır ($n=3$).

BSA içeren nanopartiküller için ise aynı prosedür uygulanmış alınan çözünme ortamından alınan numuneler BCA kit ile değerlendirilmiştir.

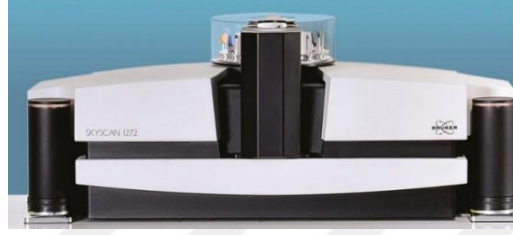
2.2.5.6. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi

2.2.5.6.1. SEM Analizi

Seçilen nanopartikül formülasyonları SEM kullanılarak görüntülenmiştir. Bu amaçla cihaz 15 kV hızlanma voltajında çalıştırılmıştır. Tüm örnekler iletken altın ile kaplandıktan (Gatan 682 PEC, ABD) sonra mikroskop (Quanta 200F ve Quanta 400F SEM, FEI, Almanya) altında incelenmiştir.

2.2.5.6.2. Mikro-BT Analizi

Nanopartiküller yüksek çözünürlüklü masaüstü mikro-BT (Bruker Skyscan 1272, Kontich, Belçika) (Şekil 2.6) ve nano-BT (Bruker Skyscan, 2214 X-Ray nanotomograph, Kontich, Belçika) (Şekil 2.7) ile taranmıştır. Tarama koşulları Çizelge 2.27 ile gösterilmiştir.



Şekil 2. 6. Bruker SkyScan 1272 Mikro-BT



Şekil 2. 7. Bruker SkyScan Nano-BT

Çizelge 2. 27. Mikro-BT ve nano-BT ile nanopartikül formülasyonlarının tarama koşulları

Parametre	Mikro-BT tarama koşulu	Nano-BT tarama koşulu
Tüp voltajı	100 kVp	100 kVp
Işın akımı	100 μ A	200 μ A
Filtre	0,5 mm Al / Cu filtre	Filtresiz
Piksel boyutu	600 nm	300 nm
Döndürme	0,2 adım, 360°	0,2 adım, 360°

Filmler için yapılmış olan mikro-BT analizinde kullanılan program ve yazılım, nanopartiküllerin kantitatif ve görsel analizi için de kullanılmıştır (NRecon yazılımı

(sürüm 1.6.10.4, SkyScan, Kontich, Belçika) ve CTAn (sürüm 1.16.1.0, SkyScan, Belçika)).

2.2.6. Nanopartikül-Film ve Nanopartikül-Greft Kombinasyonlarının Hazırlanması ve Özelliklerinin İncelenmesi

Kombinasyon formülasyonları için BMP yüklü nanopartikül formülasyonları arasından etken madde olarak sadece BMP-7 içeren N33 ve BMP-7 ve klindamisin fosfat içeren N34 (Çizelge 2.26), film formülasyonları arasından da aljinat-kitozan kompleks filmlerden AC33 (Çizelge 2.13) kullanılmıştır.

Nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonları (NG) için N33 ve N34 (Çizelge 2.26) formülasyonları ayrı ayrı hazırlanmıştır. Formülasyon hazırlanırken son santrifüjden sonra süpernatant kısmı ayrılmış geriye kalan nanopartikül süspansiyonu içerisine 50 mg alloplastik greft materyali konulmuştur. Nanopartiküllerin greftin porlarına girmesi için 200 rpm de 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra dondurulup bir gece liyofilize edilmiştir. Çizelge 2.28’de formülasyona ait bileşenler gösterilmiştir.

Nanopartikül-film kombinasyon formülasyonları (NF) için N33 ve N34 (Çizelge 2.26) yeniden hazırlanmış ve liyofilize edilmiştir. Polielektrolit kompleks film formülasyonları arasından AC33 seçilmiş ve alınacak kesitte uygun dozda BMP’nin olması için ilave edilecek nanopartikül miktarı, işlem etkinliği verilerine göre hesaplanmıştır. Hesaplı miktarda toz haldeki nanopartikül, film kurutulmadan önce manyetik karıştırıcıda 500 rpm’de karıştırılarak film materyali içinde disperse edilmiştir. Daha sonra formülasyon 5 cm çaplı cam petri kaplarına dökülüp kurutulmuştur (Çizelge 2.28).

Çizelge 2. 28. Nanopartikül-film ve nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonları

Kombinasyon bileşeni	Seçilmiş formülasyon	NF1	NF2	NG1	NG2
Nanopartikül	N33	+	-	+	-
	N34	-	+	-	+
Film	AC33	+	+	-	-
Greft	Alloplastik greft (mg)	-	-	+	+

Hazırlanmış olan nanopartikül-film ve nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonlarının özelliklerinin incelenmesi için formülasyonu oluşturan nanopartikül formülasyonlarının % işlem etkinliği ve % verimi hesaplanmış, *in vitro* etken madde çözünme hızı çalışmaları Bölüm 2.2.5.5'te ve SEM ve mikro-BT görüntüleme analizleri Bölüm 2.2.4.11 ve Bölüm 2.2.5.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra formülasyonlar *in vivo* deneylerde kullanılmıştır.

2.2.6.1. Kombinasyon Formülasyonlarında *In vitro* Çözünme Hızı Tayini

Kombinasyon formülasyonları için *in vitro* etken madde çözünme hızı deneylerinde nanopartikülden BSA'nın (BMP-7 yerine kullanılan model etken madde) (Çizelge 2.25) çıkışı incelenmiştir.

Nanopartikül-film kombinasyonları için deney Bölüm 2.2.5.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş, fakat bu kez toz nanopartikül numunesi yerine 3,5 mm çapında kesilmiş nanopartikül-film kombinasyon formülasyonu 1 mL pH 6,75 fosfat tamponu içeren ependorf tüpe koyulmuştur. Belirli zaman aralıklarında alınan numuneler BCA kit ile analiz edilmiştir.

Nanopartikül-greft kombinasyonları için de *in vitro* çözünme hızı tayini Bölüm 2.2.5.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş, toz nanopartikül numunesi yerine nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonu 1 mL pH 6,75 fosfat tamponu içeren ependorf tüpe koyulmuştur. Belirli zaman aralıklarında alınan numuneler BCA kit ile analiz edilmiştir.

2.2.7. Formülasyonlara Sterilizasyon İşleminin Uygulanması

In vivo deneylerde kullanılmak üzere seçilmiş olan nanopartikül ve kombinasyon halinde hazırlanan formülasyonlar Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'nda Co-60 kaynağından yayılan gama ışınları ile 20 kGy radyasyon dozunda sterilize edilmiştir (Alici-Garipcan ve ark., 2019; Silindir ve Ozer, 2009).

2.2.8. Seçilen Formülasyonlar için *In vivo* Deneyleerin Gerçekleştirilmesi

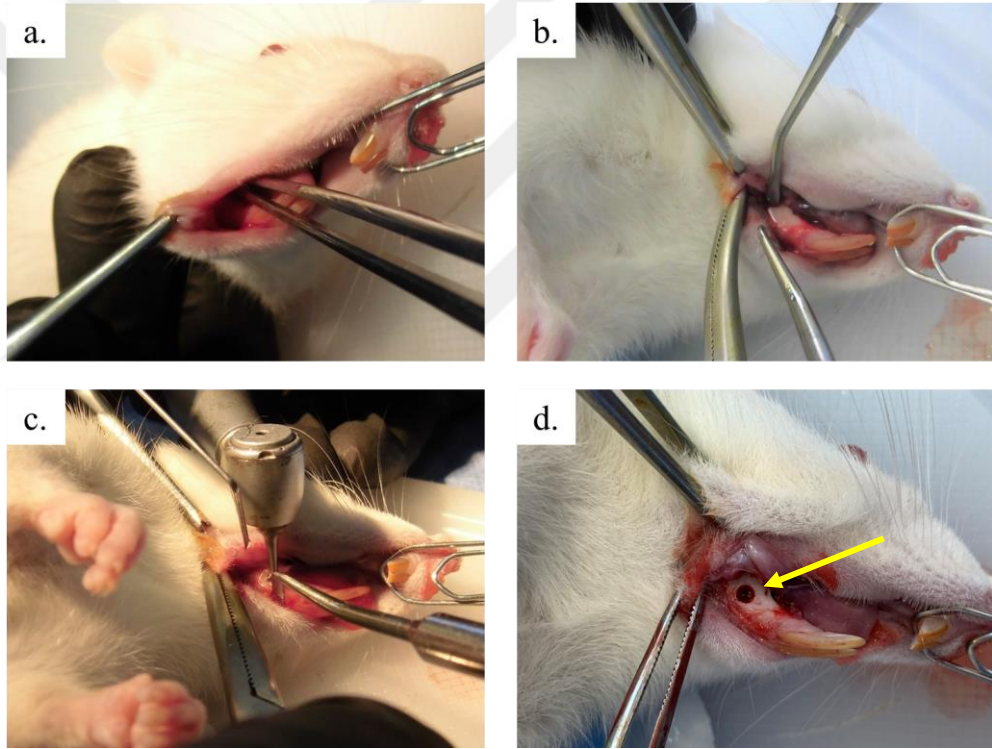
In vivo deneyleerin gerçekleştirilebilmesi için Ankara Üniversitesi Deneyle Hayvanları Yerel Etik Kurulu Onayı alınmıştır (Karar No: 2016-14-146). Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneyle Hayvanları Ünitesi'nde seksendört adet erişkin dişi Wistar-Albino rat ($\approx 300\text{g}$) ile gerçekleştirilmiştir. Ratların bakım ve beslenmeleri altlık serilmiş metal kafeslerde, 22-24 °C oda sıcaklığında, %55 nemde, 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık bir ortamda, su ve yemleri *ad libitum* verilerek yapılmıştır.

2.2.8.1. Deneyle Hayvanlarının Seçimi, Ön Hazırlığı ve Formülasyonların Uygulanması

Ratlar Çizelge 2.29 ile gösterildiği gibi rastgele 14 gruba bölünmüş ($n=6$) ve i.m. ksilazin (15 mg/kg) ve ketamin (60 mg/kg) uygulanarak anestezi altına alınmıştır. Tamamında deneyle dejenerasyon oluşturmak için rond frez kullanılarak mandibulada yaklaşık 2,5 mm'lik defektler açılmıştır (Şekil 2.8).

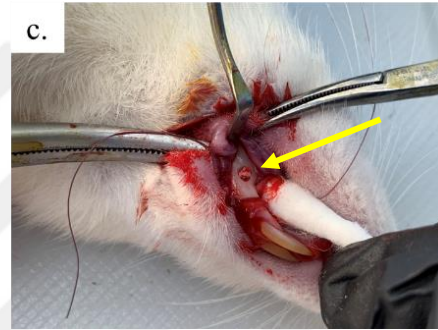
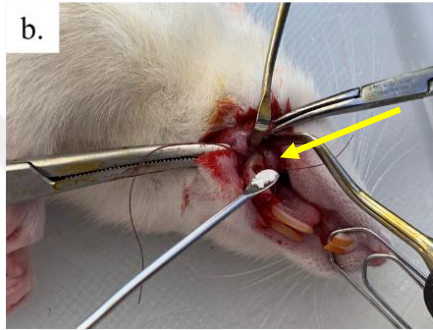
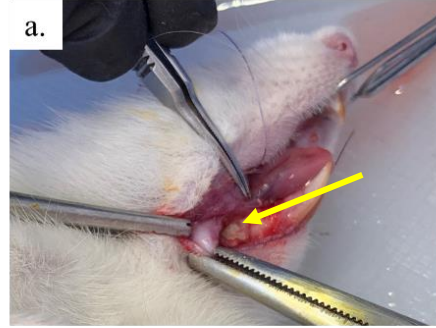
Çizelge 2. 29. *In vivo* deney grupları

Formülasyon	Grup adı	Grup başına hayvan adedi		Toplam
		2. hafta	4. hafta	
	(-) Kontrol grubu	6	6	12
Nanopartikül	N33	6	6	12
	N34	6	6	12
Film+Nanopartikül	NF1	6	6	12
	NF2	6	6	12
Graft+Nanopartikül	NG1	6	6	12
	NG2	6	6	12
Toplam		42	42	84



Şekil 2. 8. Deneysel dejeneasyon işlemi sırasında mandibulanın işleme hazır hale getirilmesi (a ve b), frez ile defektin oluşturulması (c) ve mandibulada oluşmuş defekte (d) ait görüntüler

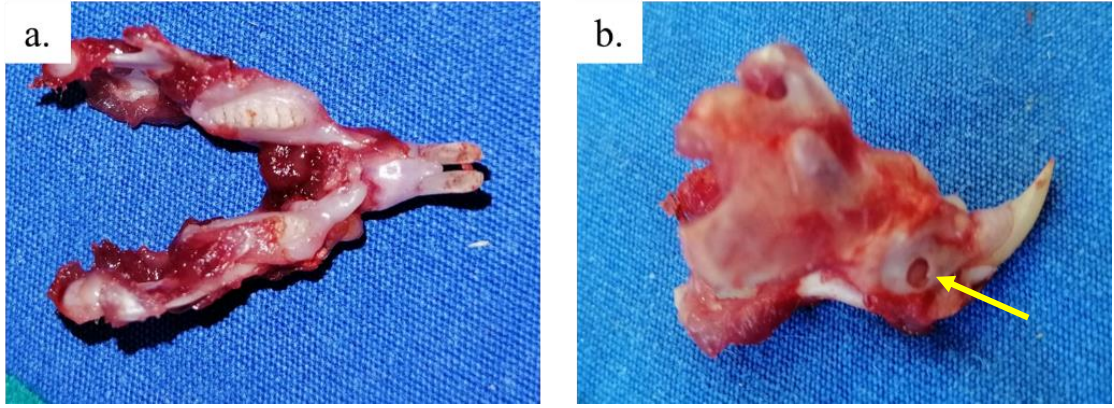
Ratlar negatif kontrol ve tedavi grupları olarak rastgele ayrılarak formülasyonlar uygulanmıştır (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9. Film formülasyonunun (a) ve toz haldeki formülasyonların (b ve c) defekte uygulanması

2.2.8.2. Hayvanların Sakrifikasyonu ve Analiz Edilecek Dokuların Çıkarılması

Hayvanlar 2. hafta ve 4. hafta sonunda CO₂ gazı ile sakrifiye edilmiş ve mandibulanın tamamı çıkarılmıştır (Şekil 2.10). Mandibular bölgedeki deri, deri altı gevşek doku, kas dokuları temizlendikten sonra kemik dokusu tamamen yumuşak dokudan arındırılmış ve %10 formalin içerisinde alınarak 48 saat tespit edilmiştir.



Şekil 2. 10. İkinci hafta sonunda çıkarılmış tüm mandibula (a) ve uygulama bölgesi (b)

2.2.8.3. Dokuların Mikro-BT Analizleri

İyileşme durumu öncelikle mikro-BT (Bruker SkyScan 1275, Belçika) ile analiz edilmiştir. Tarama koşulları Çizelge 2.30 ile gösterilmiştir. Taramadan önce formalinden çıkarılan kemik dokuları iyice kurutulmuş daha sonra örnek tutucusuna diş hekimliğinde kullanılan mumla sabitlenerek taramalar gerçekleştirilmiştir. Tarama sonucunda 3D görüntüler alınmış ve yeni oluşan kemik dokusu hacmi hesaplanmıştır.

Çizelge 2. 30. Mikro-BT ile rat mandibularının tarama koşulları

Parametre	Tarama koşulu
Tüp voltajı	100 kVp
Işın akımı	100 μ A
Filtre	0,5 mm Al / Cu filtre
Piksel boyutu	20 μ m
Döndürme	0,2 adım, 360°

2.2.8.4. Dokuların Patomorfolojik Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

Dokuların mikro-BT taramaları bittikten sonra patomorfolojik analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.8.4.1. Makroskopik İncelemeler

Kemik dokusundaki defekt bölgesi ile birlikte formülasyonların uygulamalarının yapıldığı alanda deney süreci içinde kanama, reperatif değişikliklerle ilgili fibrozis ve kondromatöz değişiklikler, kemik dokuda yangısal değişikliklere bağlı olarak düzensiz şekillenmiş yeni doku oluşumu, taşkınlık veya kemik içinde osteoporotik değişikliklere ait süngerimsi görünüş yönünden mandibula incelenmiş ve uygulamanın yapılmadığı sol ramus mandibula ile kıyaslanmıştır.

2.2.8.4.2. Mandibular Dokudan Kesit Alınması

Makroskopik incelemeler yapıldıktan sonra dokuların dekalsifiye olması için ilgili solüsyona konularak (Osteodec, Bioptica) 48 saat beklenmiştir. Belli aralıklarla dokularda yumuşama olup olmadığına dair kıvam da kontrol edilmiş ve yumuşayan mandibula üzerinde sol ve sağ rami mandibuladan geçecek şekilde ve sağ taraftaki defektli bölgenin 0,5 cm ön ve arkasından geçecek şekilde iki farklı transversal kesit uygulanmıştır. Doku kesitleri doku takip kasetlerine dik olacak şekilde yatırılmıştır..

2.2.8.4.3. Histopatolojik İncelemeler

Dokular otomatik doku takip cihazında (Leica TP1020, ABD) dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloklanmıştır. Her bir bloktan 5 µm kalınlığında kesitler alınmış, doku kesitleri rutin hematoksilin-eozin boya yöntemine göre rutin boyanmıştır (Luna, 1968). Lamlar, kamera ataçmanlı dijital ışık mikroskopunda incelenerek uygun görülen sahalardan görüntüler alınmıştır (Olympus BX51, ABD). Ardından karşılaşılan histopatolojik değişiklikler inflamasyon, kanama, vaskülarizasyon, fibrozis ve kondromatöz oluşumların yanı sıra defekt oluşturulan bölgede kemik bütünlüğünün sağlanması yönünden semikantitatif olarak x40'lık objektifle rastgele 10 saha sayılarak skorlanmıştır. Buna göre % 0 - 10 aralığı negatif

(-), % 10 – 30 aralığı hafif pozitif (+), % 30 - 70 aralığı orta pozitif (++) ve % 70 - 100 aralığı (+++) şiddetli pozitif olarak skorlanmıştır.

2.2.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için SPSS 20 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One Way Anova, Tukey testi) uygulanmıştır.

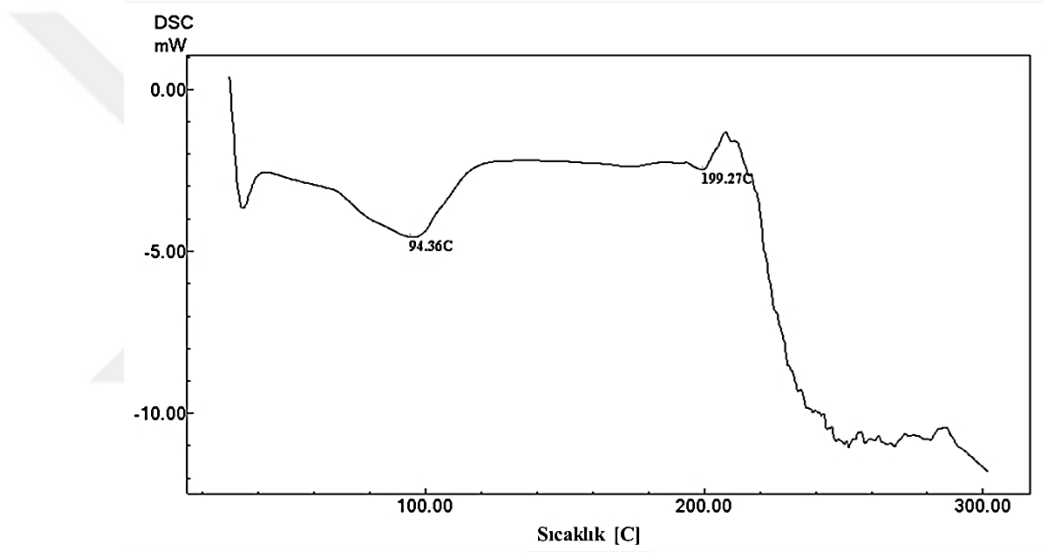


3. BULGULAR

3.1. Klindamisin Fosfat ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1. Klindamisin Fosfatın DSC Termogramı

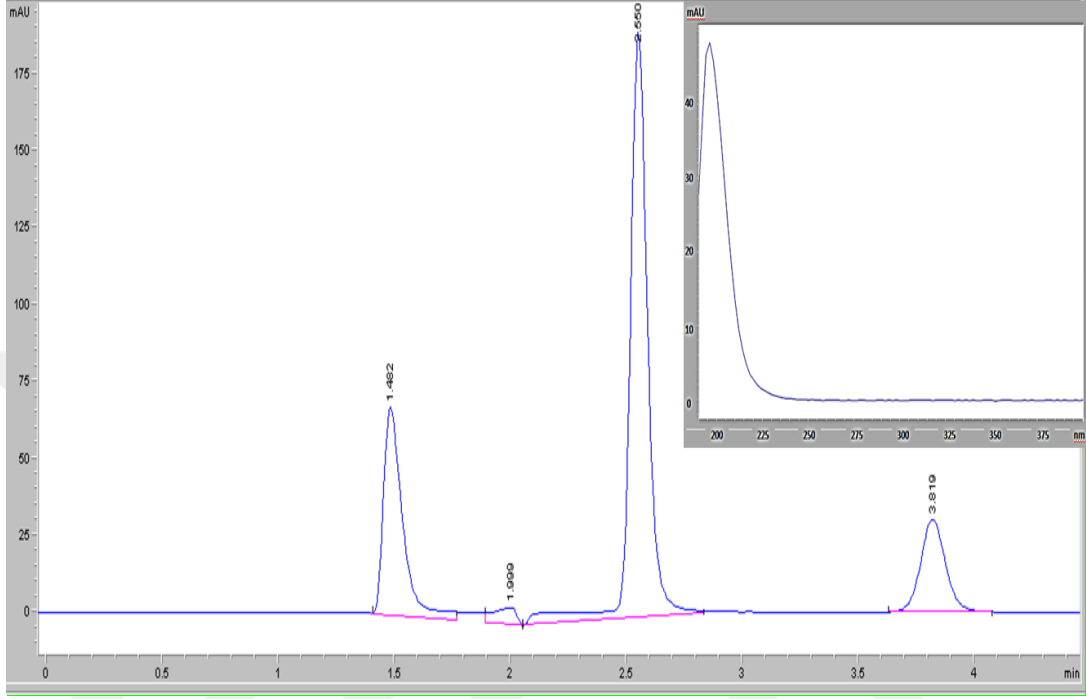
Klindamisin fosfatın termal davranışı Bölüm 2.2.1.1’de anlatıldığı şekilde DSC ile incelenmiş ve elde edilen termogram Şekil 3.1 ile gösterilmiştir.



Şekil 3. 1. Klindamisin fosfata ait DSC termogramı

3.1.2. Klindamisin Fosfatın Çözünme Ortamındaki HPLC Kromatogramı

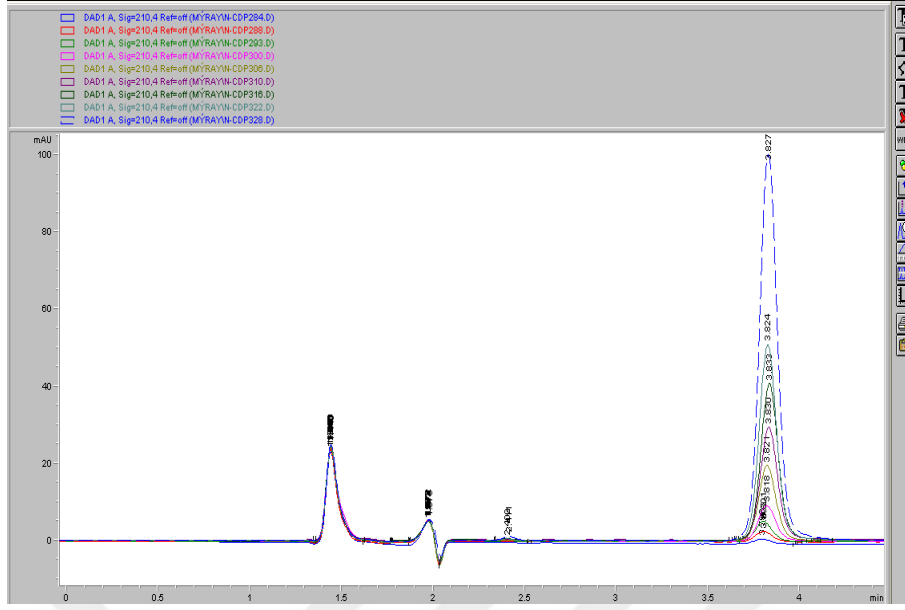
Etken maddenin HPLC ile alınan kromatogram Şekil 3.2’de yer almaktadır.



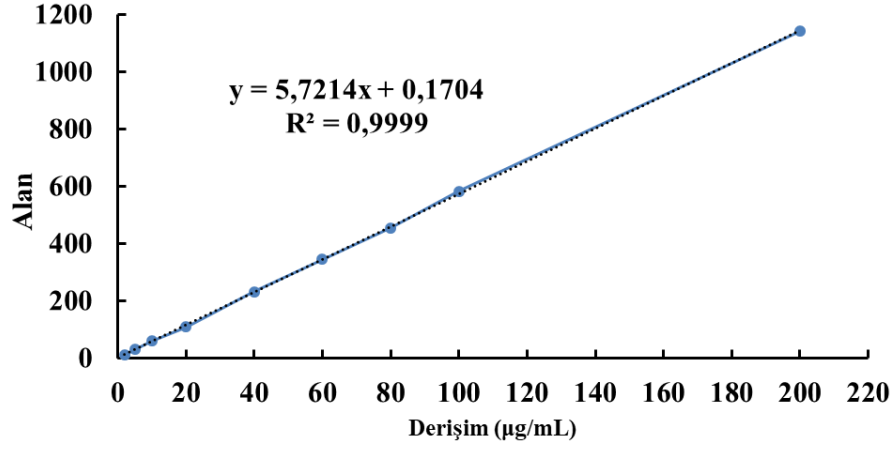
Şekil 3. 2. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponu ortamındaki HPLC kromatogramı

3.1.3. Klindamisin Fosfatın *In vitro* Çözünme Ortamında ve % 0,3 PVA Çözeltilisinde Elde Edilen Kalibrasyon Doğruları

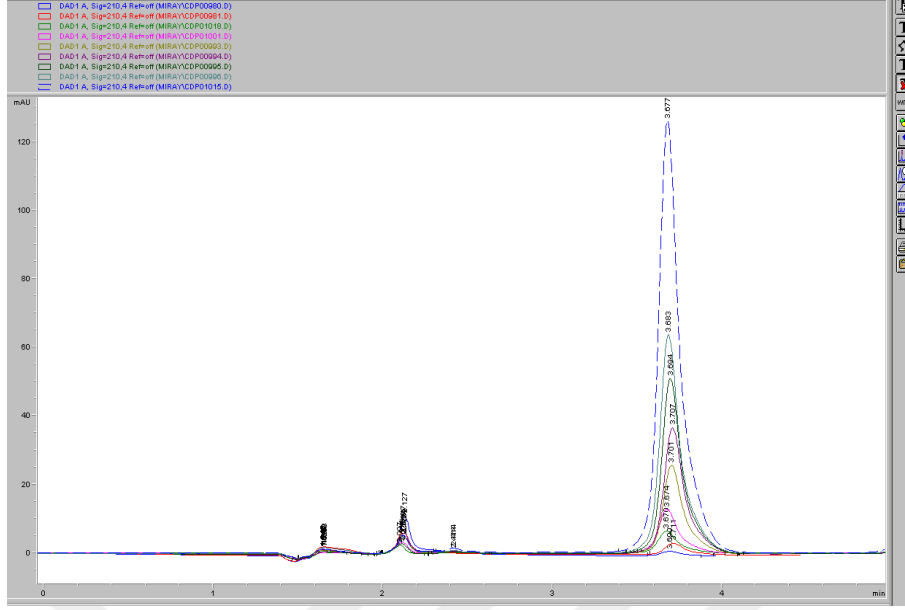
Kalibrasyon noktalarına ait HPLC kromatogramları Şekil 3.3 ve Şekil 3.5 ile gösterilmiştir. Derişime karşı elde edilen alan değerleri kullanılarak doğru denklemleri bulunmuştur (Şekil 3.4 ve Şekil 3.6) ve bu doğrulara ait veriler Çizelge 3.1 ile gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon denklemleri, işlem etkinliği ve *in vitro* çözünme hızı tayininde kullanılmıştır.



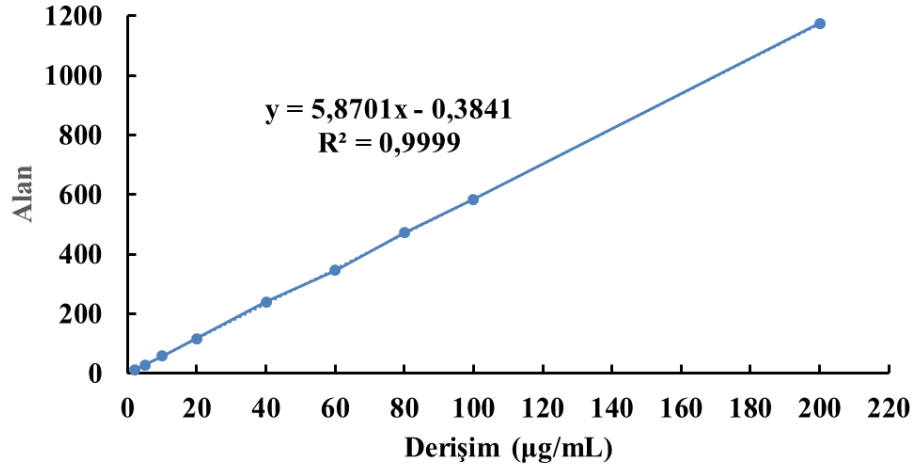
Şekil 3. 3. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki kalibrasyonuna ait HPLC kromatogramları



Şekil 3. 4. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki kalibrasyon grafiği ve denklemi



Şekil 3. 5. Klindamisin fosfatın % 0,3 PVA ortamındaki kalibrasyonuna ait HPLC kromatogramları



Şekil 3. 6. Klindamisin fosfatın % 0,3 PVA çözeltisindeki kalibrasyon grafiği ve denklemleri

Çizelge 3. 1. Klindamisin fosfatın farklı ortamlardaki kalibrasyon parametreleri

Ortam	Eğim (m)	Kesişim (n)	Determinasyon Katsayısı (r ²)	Sy.x*
pH 6,75 fosfat tamponu	5,7214	0,1704	0,9999	4,651
% 0,3 PVA	5,8701	- 0,3841	0,9999	1,011

*Regresyon doğrusundan olan sapmalara ait standart sapma

3.1.4. Klindamisin Fosfat'ın HPLC Yöntemi ile Miktar Tayininin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular

3.1.4.1. Doğruluk

Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponu ve % 0,3 PVA çözeltisi içerisindeki miktar tayininin doğruluğuna ve geri eldesine ilişkin elde edilen bulgular ve ilgili parametreler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Klindamisin fosfatın miktar tayini yöntemlerinin doğruluk ve geri eldesine ait bulgular

Ortam	5 µg/mL		40 µg/mL		100 µg/mL	
pH 6,75 fosfat tamponu	Pratik derişim (µg/mL)	% Geri elde	Pratik derişim (µg/mL)	% Geri elde	Pratik derişim (µg/mL)	% Geri elde
	5,00	100,08	39,72	99,29	98,08	98,08
	5,14	102,88	39,79	99,46	97,90	97,90
	5,21	104,27	39,82	99,55	97,85	97,85
	5,25	104,97	39,38	98,46	97,80	97,80
	5,13	102,53	39,34	98,35	97,94	97,94
	5,02	100,43	39,56	98,90	97,74	97,74
	Ort.	102,53	Ort.	99,00	Ort.	97,88
	SS	1,98	SS	0,51	SS	0,12
%BSS	1,93	%BSS	0,52	%BSS	0,12	
% 0,3 PVA çözeltisi	Pratik derişim (µg/mL)	% Geri elde	Pratik derişim (µg/mL)	% Geri elde	Pratik derişim (µg/mL)	% Geri elde
	5,04	100,80	40,24	100,59	95,69	95,69
	4,99	99,77	39,32	98,29	95,52	95,52
	5,01	100,11	38,91	97,27	95,36	95,36
	5,09	101,82	39,16	97,90	95,41	95,41
	4,97	99,43	39,03	97,56	95,29	95,29
	5,04	100,80	40,08	100,20	94,83	94,83
	Ort.	100,46	Ort.	98,63	Ort.	95,35
	SS	0,86	SS	1,41	SS	0,29
%BSS	0,86	%BSS	1,43	%BSS	0,30	

3.1.4.2. Kesinlik

Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponu ve % 0,3 PVA çözeltisi içerisindeki kalibrasyonunun kesinliğinin saptanmasında tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri incelenmiştir.

Tekrarlanabilirlik; Klindamisin fosfatın PBS ve % 0,3 PVA çözeltisi içerisindeki miktar tayininin tekrarlanabilirliğine ilişkin elde edilen bulgular ve ilgili parametreler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3. 3. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin bulgular

PBS		Alan	5 µg/mL	Alan	40 µg/mL	Alan	100 µg/mL	
Ara kesinlik	Tekrarlanabilirlik	Gün 1	28,80	5,00	224,80	39,26	555,40	97,04
			29,60	5,14	227,40	39,72	555,10	96,99
			29,90	5,20	226,50	39,56	554,60	96,90
			30,00	5,21	225,10	39,31	556,30	97,20
			29,90	5,20	224,00	39,12	553,20	96,66
			30,20	5,25	224,70	39,24	553,70	96,75
			Ort.	5,17	Ort.	39,37	Ort.	96,92
			SS	0,09	SS	0,22	SS	0,20
			%BSS	1,68	%BSS	0,57	%BSS	0,21
			Günler arası	Gün 2	28,90	5,02	227,80	39,79
	30,10	5,23			228,00	39,82	560,50	97,94
	29,80	5,18			226,50	39,56	559,30	97,73
	30,20	5,25			226,20	39,51	560,00	97,85
	29,80	5,18			226,90	39,63	559,70	97,80
	30,10	5,23			226,70	39,59	561,30	98,08
	Gün 3	30,30		5,27	224,90	39,28	556,90	97,31
		30,10		5,23	225,10	39,31	556,40	97,22
		30,00		5,21	225,40	39,37	555,90	97,13
		30,10		5,23	224,80	39,26	556,50	97,24
		30,10		5,23	225,40	39,37	556,80	97,29
		30,50		5,30	224,50	39,21	556,40	97,22
	Ort.	5,20		Ort.	39,44	Ort.	97,30	
	SS	0,08		SS	0,21	SS	0,41	
	%BSS	1,47		%BSS	0,54	%BSS	0,42	

Ara kesinlik; Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponu içerisindeki miktar tayininin ara kesinliğine ilişkin elde edilen bulgular ve ilgili parametreler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3. 4. Klindamisin fosfatın % 0,3 PVA çözeltisindeki miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin bulgular

% 0,3 PVA		Alan	5 µg/mL	Alan	40 µg/mL	Alan	100 µg/mL	
Ara kesinlik	Tekrarlanabilirlik	Gün 1	29,20	5,04	235,80	40,24	561,30	95,69
			28,90	4,99	230,40	39,32	560,30	95,52
			29,00	5,01	228,00	38,91	559,40	95,36
			29,50	5,09	229,50	39,16	559,70	95,41
			28,80	4,97	228,70	39,03	559,00	95,29
			29,20	5,04	234,89	40,08	556,30	94,83
			Ort.	5,02	Ort.	39,45	Ort.	95,35
			SS	0,04	SS	0,56	SS	0,29
			%BSS	0,86	%BSS	1,43	%BSS	0,30
			Günler arası	Gün 2	29,50	5,09	225,10	38,41
	29,90	5,16			226,50	38,65	556,80	94,92
	28,20	4,87			227,8	38,87	556,40	94,85
	30,20	5,21			226,30	38,62	555,30	94,66
	29,90	5,16			228,00	38,91	555,90	94,77
	29,83	5,15			226,70	38,68	555,50	94,70
	Gün 3	29,80		5,14	226,90	38,72	560,00	95,46
		28,90		4,99	226,30	38,62	554,70	94,56
		29,80		5,14	226,50	38,65	556,90	94,94
		29,98		5,17	227,80	38,87	556,40	94,85
		30,10		5,19	226,30	38,62	555,10	94,63
		30,00		5,18	228,00	38,91	556,30	94,83
	Günler arası	Ort.		5,09	Ort.	38,96	Ort.	95,01
		SS		0,09	SS	0,49	SS	0,35
		%BSS		1,86	%BSS	1,25	%BSS	0,37

3.1.4.3. Seçicilik

Seçicilik analiz edilen maddeyi diğer bileşenler varlığında tayin edebilme özelliğidir. Seçicilik testi için formülasyonda kullanılan maddelerin tek başına ve etken madde ile hazırlanan karışımları 210 nm dalgaboyunda HPLC ile analiz edilmiş, girişim olmadığı görülmüştür.

3.1.4.4. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

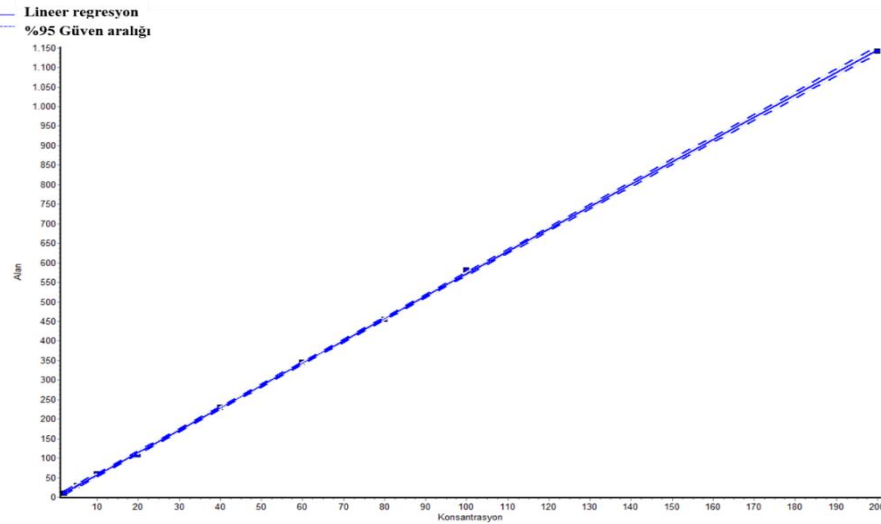
ICH kaynaklarında verilen formüllere göre (Bölüm 2.2.3.4) hesaplanarak elde edilen bu sonuçlar kalibrasyon doğrusunu oluşturan alt sınırın (2 µg/mL) altında yer almaktadır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3. 5. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki ve % 0,3 PVA çözeltisindeki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırlarına ilişkin bulgular

	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
pH 6,75 fosfat tamponu	0,31	0,95
% 0,3 PVA	0,57	1,72

3.1.4.5. Doğrusallık

Hazırlanan derişimlere karşılık gelen alan değerleri InStat GraphPad (Version 3.0) programı kullanılarak % 95 güven aralığını da gösteren kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve Şekil 3.7 ile gösterilmiştir.

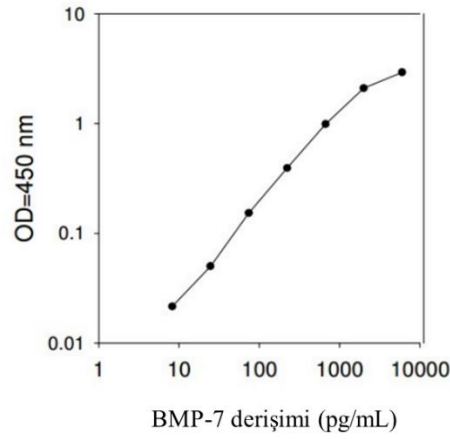


Şekil 3. 7. Klindamisin fosfatın pH 6,75 fosfat tamponundaki %95 olasılıkla güven aralığı içinde yer aldığını gösteren kalibrasyon grafiği

3.2. Kemik Morfogenetik Proteinin Miktar Tayinine Ait Bulgular

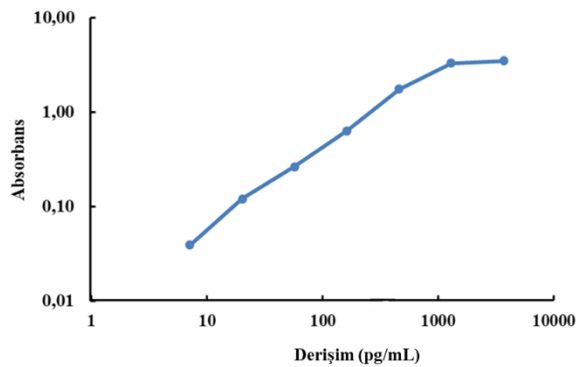
3.2.1. BMP'nin ELISA Kit ile Kalibrasyonuna Ait Bulgular

BMP-7'ye ait ELISA kit analiz sertifikasında verilmiş olan 450 nm'de derişime karşı absorbans değerlerinin logaritmik grafiği Şekil 3.8 ile gösterilmiştir.

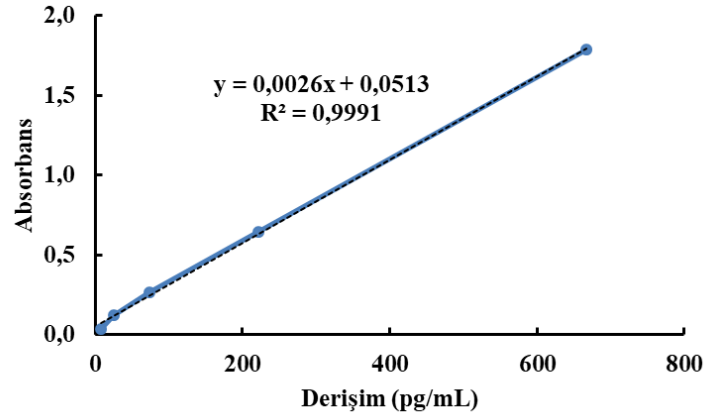


Şekil 3. 8. BMP-7'nin ELISA kit analiz sertifikasında verilmiş olan kalibrasyonuna ait logaritmik grafik (RAB0033)

BMP-7'nin analiz sertifikasında yer alan prosedüre göre yapılış olan analizler sonucunda bilinen derişim değerlerine karşılığ gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10).



Şekil 3. 9. BMP-7'nin ELISA kit ile kalibrasyonuna ait logaritmik grafik



Şekil 3. 10. BMP-7'nin ELISA kit ile kalibrasyonuna ait doğru grafiği ve denklemini

3.2.2. BMP'nin ELISA Kit ile Validasyonuna Ait Bulgular

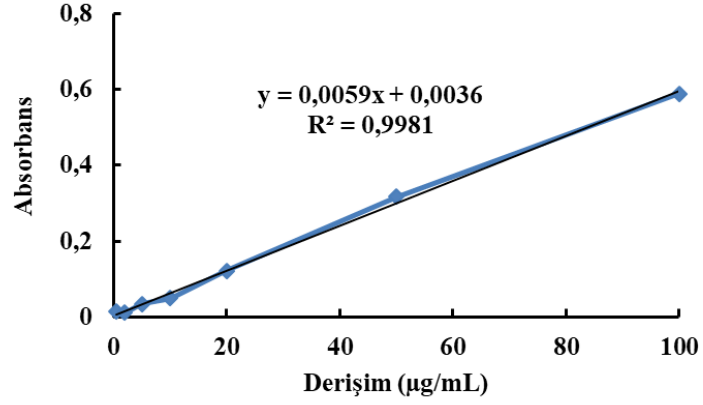
ELISA kit sertifikasında yer alan validasyon verileri Çizelge 3.6 ile verilmiştir.

Çizelge 3. 6. BMP-7'nin ELISA yöntemi ile validasyonuna ait bulgular (RAB0033)

Validasyon parametresi	Sertifikada yer alan veriler
LOD	10 pg/mL
% Geri elde (Doğruluk)	% 97,11
Doğrusallık	% 98
Varyasyon katsayısı (Tekrarlanabilirlik)	< % 10
Seçicilik	Test edilmiş sitokinlerin hiçbirleriyle çapraz reaksiyon göstermemiştir.

3.2.3. BSA'nın BCA Kit ile Kalibrasyonuna Ait Bulgular

Model etken madde olarak kullanılan BSA'nın BCA kit kullanılarak elde edilmiş absorbans verileri derişime karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon denklemini elde edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3. 11. BSA'nın BCA kit ile kalibrasyonuna ait grafik ve kalibrasyon denklemini

3.3. Film Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular

3.3.1. Filmlerin Döküm Öncesi Viskozluğu, Film Kalınlık ve Ağırlığına Ait Bulgular

Film formülasyonları için viskozite analizleri Bölüm 2.2.4.4'te, ağırlık ve kalınlık tayinleri ise Bölüm 2.2.4.6'da anlatılmış olduğu şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları Çizelge 3.7 - Çizelge 3.9 ile gösterilmiştir.

Çizelge 3. 7. Kitozan ile hazırlanan formülasyonların viskozite, kalınlık ve ağırlık değerleri

Formülasyon	*Viskozite (Pa.s) ± SS	†Kalınlık (µm) ± SS	†Ağırlık*** (mg) ± SS
C1	0,40 ± 0,01	-	-
C2	0,41 ± 0,00	-	-
C3	0,52 ± 0,00	-	-
C4	0,90 ± 0,00	-	-
C5	0,93 ± 0,01	-	-
C6	0,94 ± 0,00	-	-
C7	0,38 ± 0,03	546,6 ± 12,1	5,65 ± 0,25
C8	0,42 ± 0,03	515,0 ± 24,3	6,00 ± 0,58
C9	0,55 ± 0,00	555,0 ± 32,7	6,31 ± 0,27
C10	0,87 ± 0,03	526,7 ± 32,0	5,56 ± 0,50
C11	0,94 ± 0,05	541,7 ± 20,4	5,78 ± 0,32
C12	0,87 ± 0,03	563,3 ± 13,7	6,15 ± 0,44
C13	5,47 ± 0,06	875,0 ± 37,8	10,40 ± 0,91
C14	18,40 ± 0,10	778,3 ± 63,7	10,50 ± 0,88
C15	0,02 ± 0,00	660,0 ± 44,3	5,88 ± 0,86
C16	0,38 ± 0,12	741,7 ± 65,2	7,98 ± 0,91
C17	0,68 ± 0,08	731,7 ± 27,1	7,95 ± 0,39

*n=3; †n=6; **C1-C6 formülasyonları için kalınlık ve ağırlık tayinleri yapılmamıştır.

***Tüm filmler 3,5 mm çapında kesilerek tartılmıştır.

Çizelge 3. 8. Aljinat ile hazırlanan formülasyonların viskozite, kalınlık ve ağırlık değerleri

Formülasyon	*Viskozite (Pa.s) ± SS	†Kalınlık (µm) ± SS	†Ağırlık (mg) ± SS
A2	0,18 ± 0,03	588,3 ± 60,5	6,45 ± 0,58
A3	0,19 ± 0,04	690,0 ± 56,6	8,27 ± 0,58
A4	0,35 ± 0,00	583,3 ± 48,9	7,50 ± 0,74
A5	0,73 ± 0,03	830,0 ± 82,0	9,33 ± 0,83
A6	0,22 ± 0,03	590,0 ± 46,9	6,40 ± 0,72
A7	0,77 ± 0,03	718,3 ± 17,2	7,97 ± 0,33
A8	2,30 ± 0,05	716,7 ± 55,4	7,68 ± 0,49
A9	5,82 ± 0,03	925,1 ± 28,1	11,50 ± 0,78

*n=3; †n=6

Aljinat-kitozan kompleks filmlerde AC14 formülasyonuna kadar hazırlanmış filmlerde homojen bir yapı elde edilemediği için Çizelge 3.9 ile verilmiş olan formülasyonlar AC14'ten itibaren gösterilmiştir.

Çizelge 3. 9. Aljinat-kitozan kompleksi ile hazırlanan formülasyonların viskozite, kalınlık ve ağırlık değerleri

Formülasyon	*Viskozite (Pa.s) ± SS	†Kalınlık (µm) ± SS	†Ağırlık (mg) ± SS
AC14	0,27 ± 0,03	445,0 ± 33,91	5,27 ± 0,48
AC15	0,47 ± 0,03	676,6 ± 163,4	5,73 ± 2,68
AC16	6,40 ± 0,13	646,7 ± 147,1	6,25 ± 1,46
AC17	0,23 ± 0,06	485,0 ± 32,71	5,01 ± 0,66
AC18	0,40 ± 0,05	478,3 ± 55,29	6,72 ± 1,89
AC19	2,20 ± 0,36	1213 ± 173,1	5,77 ± 1,01
AC20	0,33 ± 0,03	700,0 ± 38,99	6,48 ± 0,79
AC21	1,70 ± 0,03	743,3 ± 141,30	6,85 ± 0,42
AC22	2,93 ± 0,20	671,7 ± 110,10	7,65 ± 2,09
AC23	0,11 ± 0,04	505,0 ± 35,64	5,78 ± 0,62
AC24	0,80 ± 0,00	643,3 ± 35,59	6,42 ± 0,59
AC25	2,57 ± 0,03	556,7 ± 84,30	6,42 ± 1,55
AC26	0,64 ± 0,04	688,3 ± 141,10	6,87 ± 1,74
AC27	3,27 ± 0,03	1903,0 ± 254,90	10,81 ± 3,37
AC28	4,13 ± 0,15	820,0 ± 36,88	10,86 ± 2,05
AC29	11,90 ± 0,31	713,3 ± 218,46	12,0 ± 2,63
AC30	1,05 ± 0,05	936,7 ± 223,7	7,53 ± 2,17
AC31	1,30 ± 0,05	1167,0 ± 110,23	8,87 ± 1,18
AC32	2,88 ± 0,13	546,7 ± 98,66	7,15 ± 1,14
AC33	6,08 ± 0,08	833,3 ± 55,08	8,42 ± 2,86
AC34	1,07 ± 0,07	560,0 ± 36,52	6,77 ± 3,42
AC35	5,63 ± 0,12	485,0 ± 51,96	6,22 ± 1,73
AC36	2,50 ± 0,10	757,5 ± 91,42	7,92 ± 0,74
AC37	3,83 ± 0,85	1143,0 ± 168,44	6,80 ± 2,40
AC38	0,30 ± 0,00	515,0 ± 65,57	6,25 ± 1,09
AC39	0,80 ± 0,00	555,0 ± 65,45	6,27 ± 0,73
AC40	3,73 ± 0,42	982,5 ± 295,3	12,93 ± 2,28
AC41	9,97 ± 0,25	1503,0 ± 164,62	7,85 ± 1,35

*n=3; †n=6

3.3.2. Filmlerin İşlem Etkinliği ve Şişme Özelliklerine Ait Bulgular

Film formülasyonlarına etken maddenin yüklenme yüzdesi % işlem etkinliği hesaplanarak bulunmuş ve Çizelge 3.10, Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12’de sırayla kitozan, aljinat ve kompleks filmler için gösterilmiştir. Ayrıca % şişme derecesi de Bölüm 2.2.4.9 da anlatıldığı şekilde Eşitlik 2.3 kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.10 - Çizelge 3.12).

Kitozan filmlerde C7 ye kadar olan filmler etken madde içermeyen deneme formülasyonları olduğu için değerlendirmeye dahil edilmemiştir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3. 10. Kitozan film formülasyonlarına ait % işlem etkinliği ve ikinci saat şişme verileri

Formülasyon	†İşlem Etkinliği (%) ± SS	*Şişme Derecesi (%) ± SS
C7	99,5 ± 7,09	288,1 ± 52,56
C8	98,8 ± 3,67	177,8 ± 73,76
C9	81,2 ± 4,39	259,7 ± 48,67
C10	94,6 ± 12,0	210,9 ± 75,83
C11	67,4 ± 3,38	207,0 ± 34,94
C12	75,8 ± 3,93	200,0 ± 30,37
C13	74,3 ± 11,7	350,7 ± 59,16
C14	58,6 ± 11,4	274,5 ± 53,91
C15	97,2 ± 12,5	266,4 ± 59,24
C16	81,4 ± 5,01	228,4 ± 97,22
C17	76,5 ± 2,22	193,9 ± 68,96

*n=3; †n=6

Çizelge 3. 11. Aljinat film formülasyonlarına ait % işlem etkinliği verileri

Formülasyon	†İşlem Etkinliği (%) ± SS	*Şişme Derecesi (%) ± SS
A2	99,3 ± 7,54	-
A3	90,0 ± 4,01	-
A4	84,8 ± 2,82	-
A5	88,7 ± 2,97	-
A6	93,6 ± 7,16	-
A7	85,9 ± 1,90	-
A8	77,9 ± 2,55	-
A9	86,5 ± 3,22	-

*n=3; †n=6

**Filmler çözündüğü için şişme dereceleri hesaplanamamıştır.

Çizelge 3. 12. Aljinat-kitozan kompleks film formülasyonlarına ait % işlem etkinliği verileri

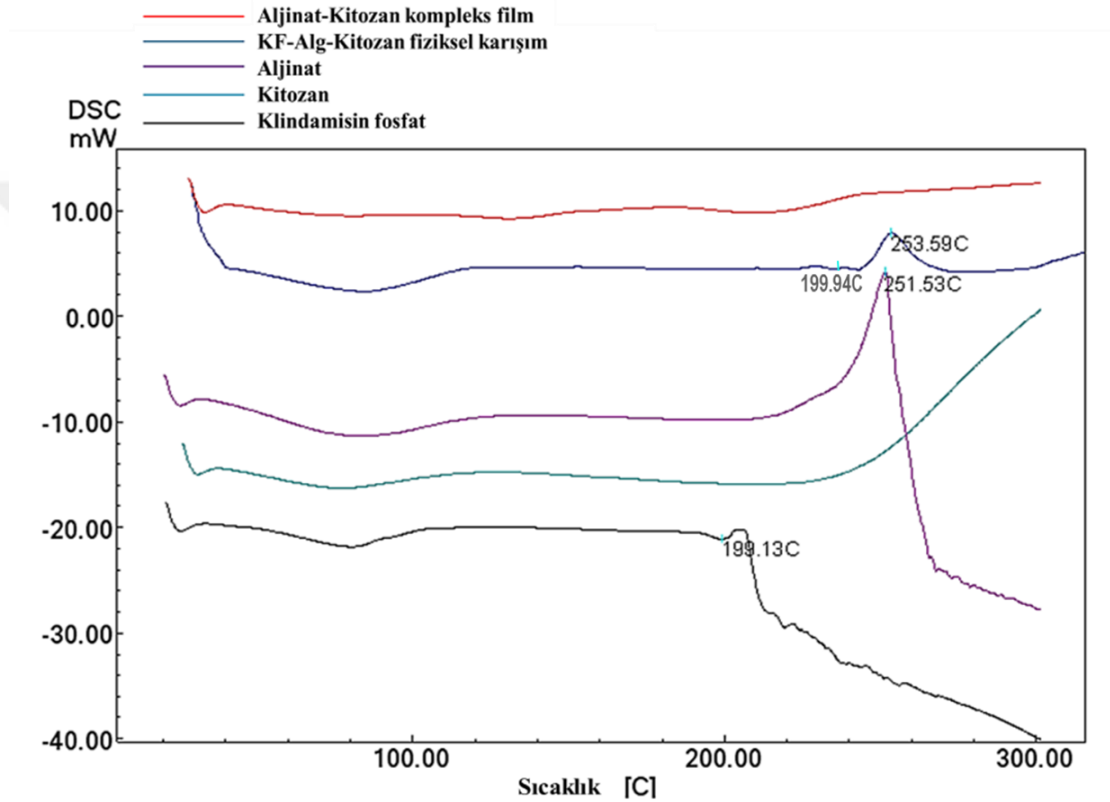
Formülasyon	†İşlem Etkinliği (%) ± SS	*Şişme Derecesi (%) ± SS
AC14	56,6 ± 6,84	88,10 ± 5,4
AC15	68,3 ± 4,21	129,0 ± 30,8
AC16	74,7 ± 14,70	384,7 ± 87,0
AC17	58,4 ± 4,72	44,70 ± 12,9
AC18	63,9 ± 8,88	198,0 ± 77,7
AC19	63,4 ± 8,08	119,5 ± 35,4
AC20	71,5 ± 6,61	-
AC21	75,1 ± 3,79	-
AC22	79,4 ± 10,49	-
AC23	55,4 ± 6,35	-
AC24	62,7 ± 2,96	-
AC25	76,7 ± 7,33	-
AC26	109,0 ± 7,11	17,30 ± 7,8
AC27	96,9 ± 10,56	191,0 ± 20,5
AC28	48,8 ± 2,93	383,6 ± 66,3
AC29	48,7 ± 5,76	405,7 ± 37,9
AC30	67,1 ± 5,85	103,9 ± 41,5
AC31	70,0 ± 2,77	126,5 ± 55,4
AC32	43,9 ± 3,81	544,9 ± 22,1
AC33	90,0 ± 13,12	473,2 ± 79,3
AC34	70,1 ± 12,90	368,9 ± 63,2
AC35	74,6 ± 14,37	365,4 ± 56,8
AC36	80,9 ± 5,80	187,5 ± 62,4
AC37	73,4 ± 11,40	167,9 ± 44,6
AC38	76,8 ± 10,0	284,4 ± 80,2
AC39	69,5 ± 3,62	116,7 ± 77,1
AC40	73,1 ± 3,08	194,3 ± 11,6
AC41	71,7 ± 7,24	398,0 ± 60,8

*n=3; †n=6

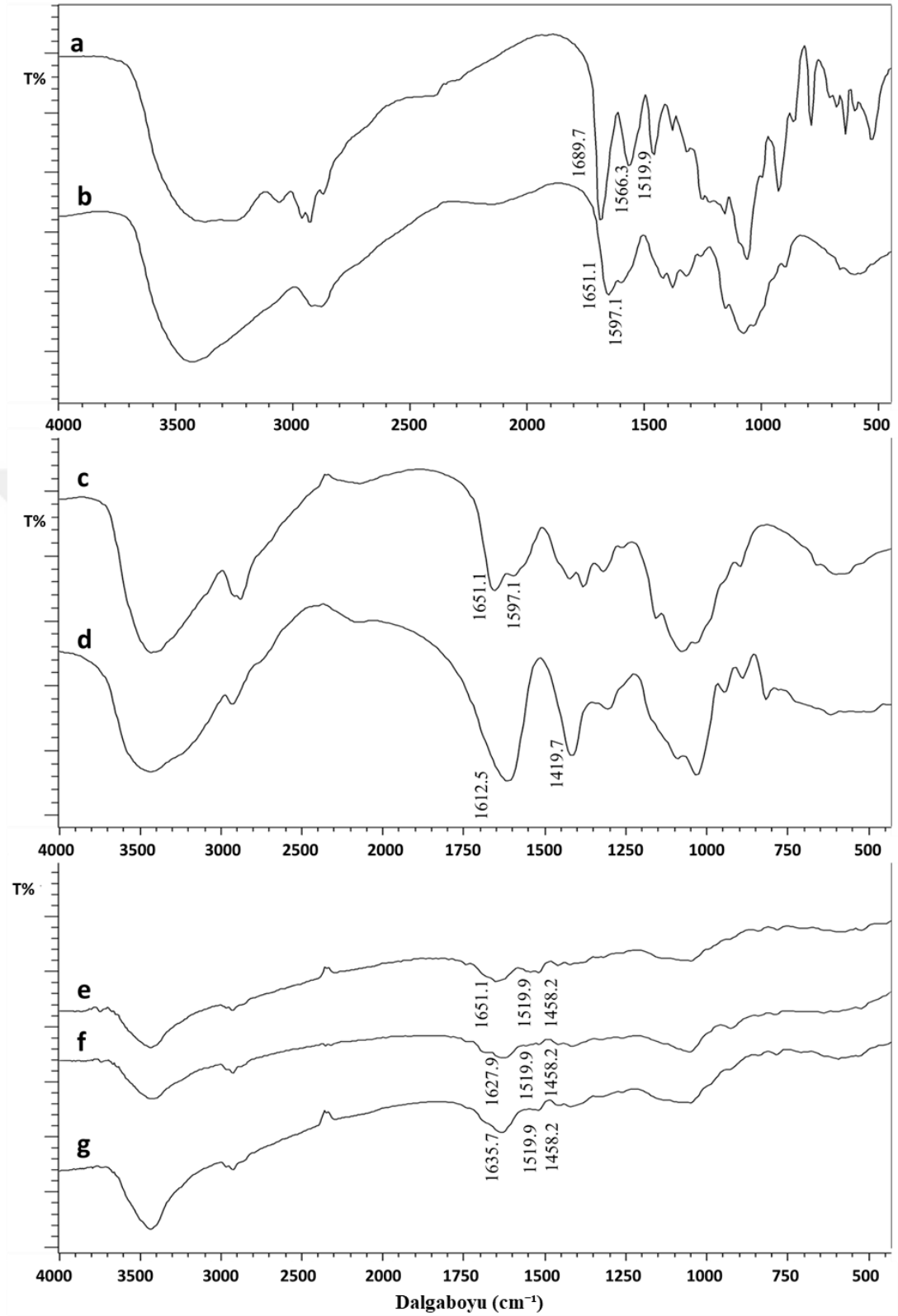
**Filmler çözündüğü için şişme dereceleri hesaplanamamıştır.

3.3.3. Kompleks Film Formülasyonlarında DSC ve FTIR Analizlerine Ait Bulgular

Aljinat-kitozan kompleks film, aljinat, kitozan, klindamisin fosfat ve etken madde ile polimerlerin fiziksel karışımlarına ait DSC termogramları Şekil 3.12, FTIR spektrumları ise Şekil 3.13 ile gösterilmiştir.



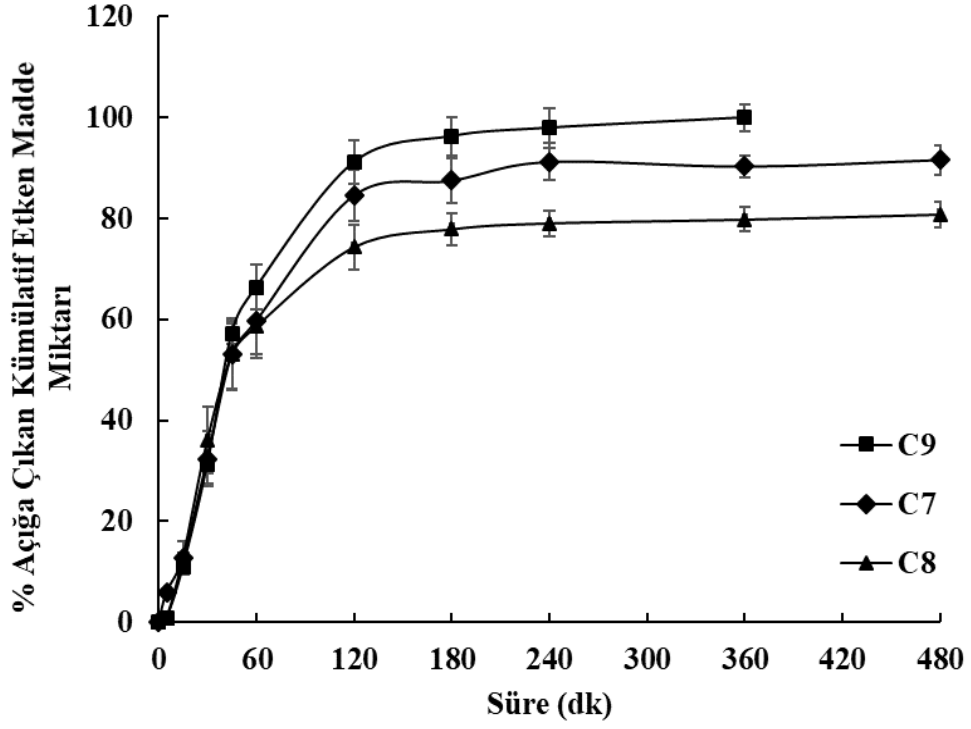
Şekil 3. 12. Kompleks film, etken madde ve polimerlere ait DSC termogramları



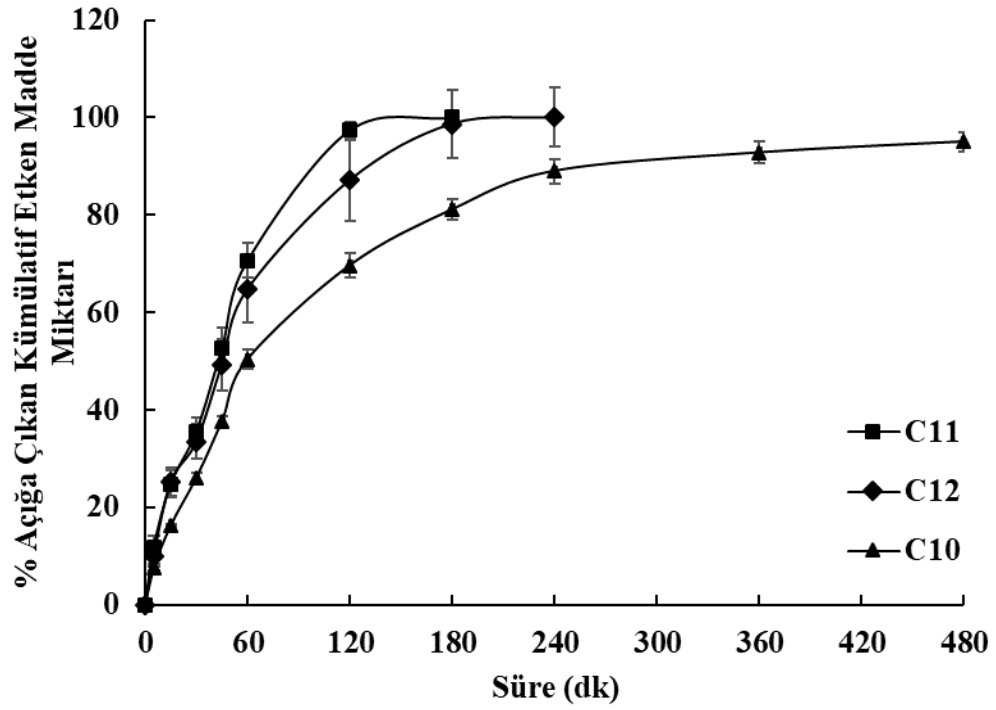
Şekil 3. 13. Klindamisin fosfat (a), orta molekül ağırlıklı kitozan (b), düşük molekül ağırlıklı kitozan (c), sodyum aljinat (d), AC15 (e), AC21 (f) ve AC18'e (g) ait FTIR spektrumları

3.3.4. Filmlerin *In vitro* Çözünme Hızı Deneyine Ait Bulgular

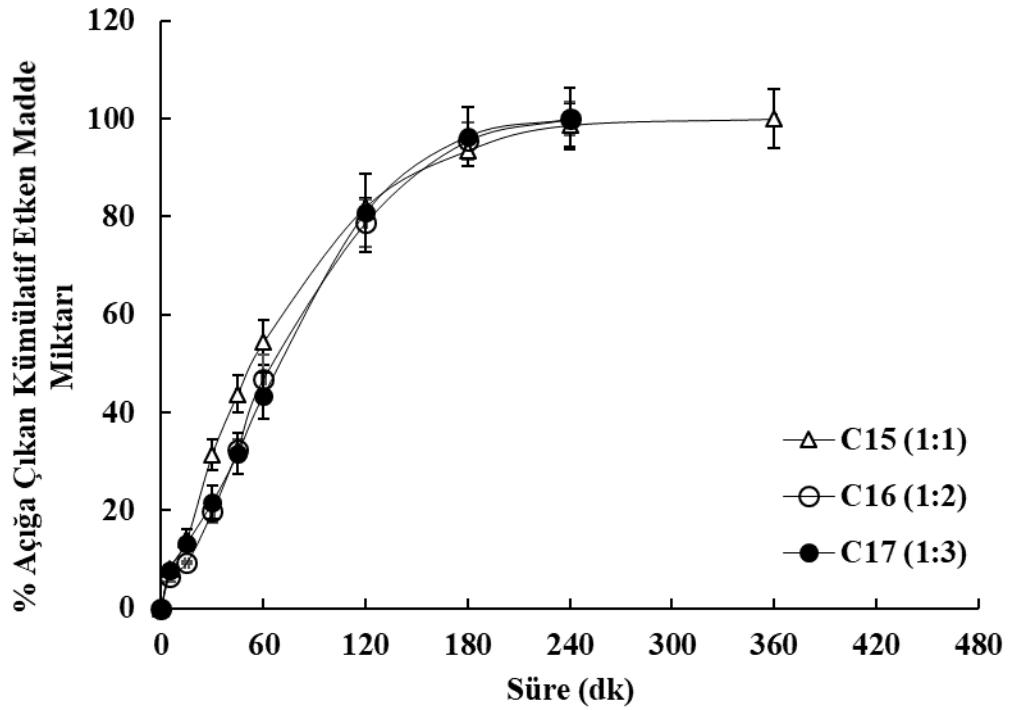
Film formülasyonlarının *in vitro* çözünme hızı deneyleri Bölüm 2.2.4.7'de anlatılmış olduğu şekilde gerçekleştirilmiş ve çözünme hızı profilleri Şekil 3.14 - Şekil 3.28 ile verilmiştir.



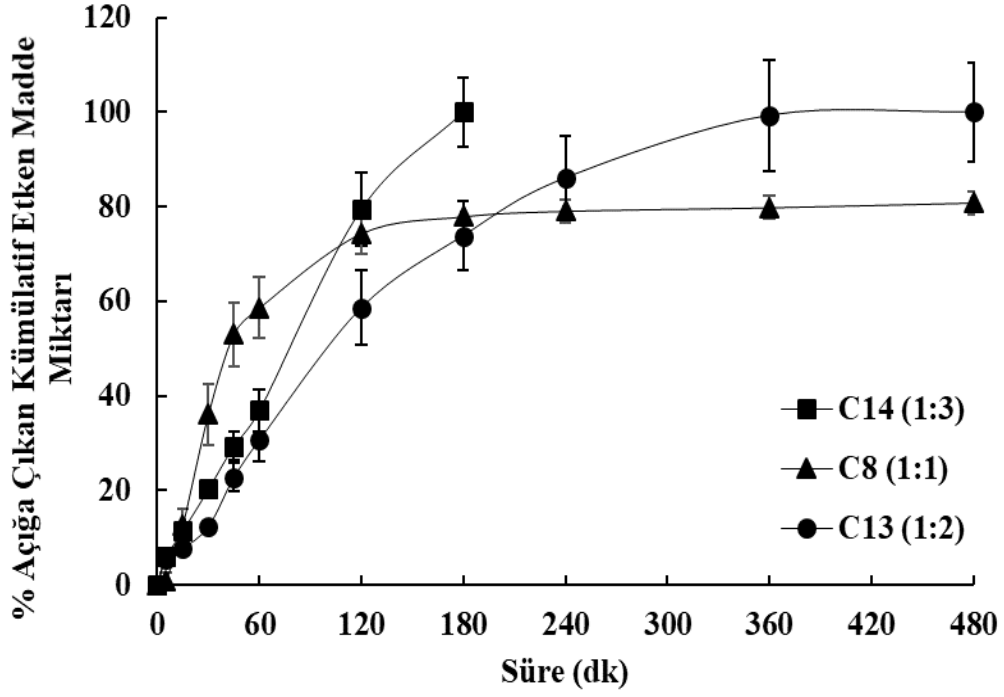
Şekil 3. 14. Farklı konsatrasyonda asetik asit kullanılan orta molekül ağırlıklı kitozan filmlerin *in vitro* etken madde çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)



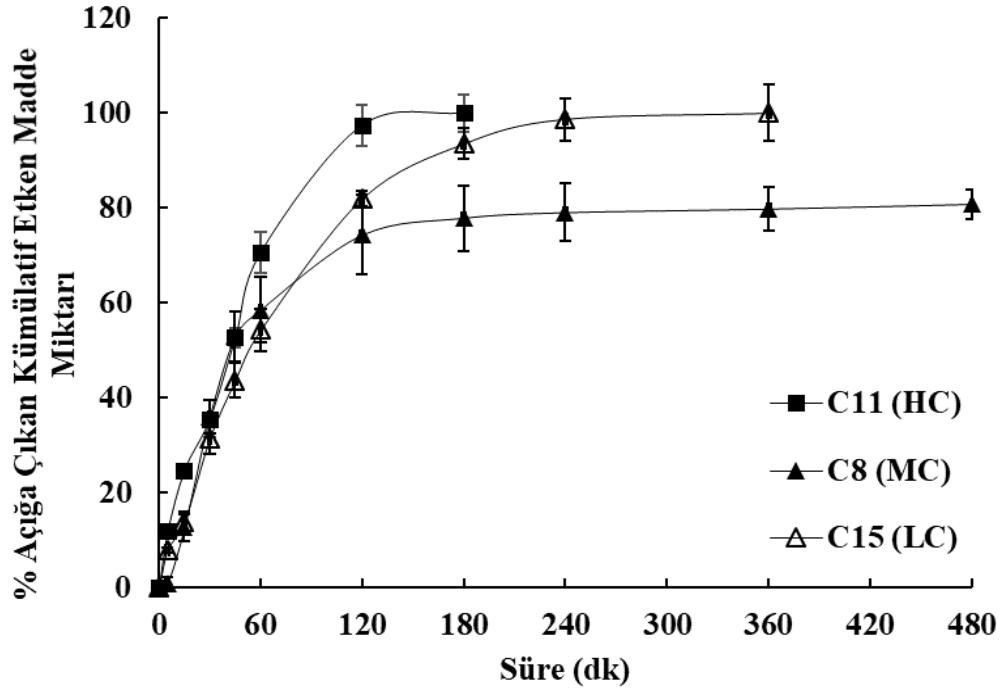
Şekil 3. 15. Farklı konsantrasyonda asetik asit kullanılan yüksek molekül ağırlıklı kitozan filmlerin *in vitro* etken madde çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)



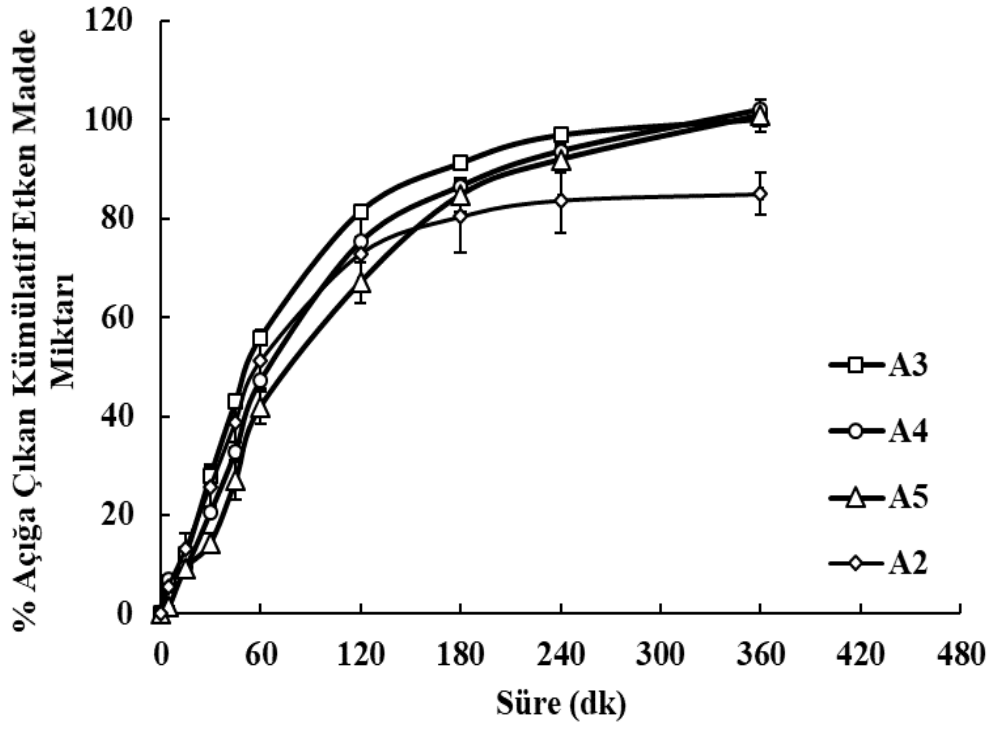
Şekil 3. 16. Düşük molekül ağırlıklı kitozan çözeltisi kullanılan formülasyonlarda farklı etken madde:polimer oranlarının *in vitro* etken madde çözünme hızına etkisi ($n=3$)



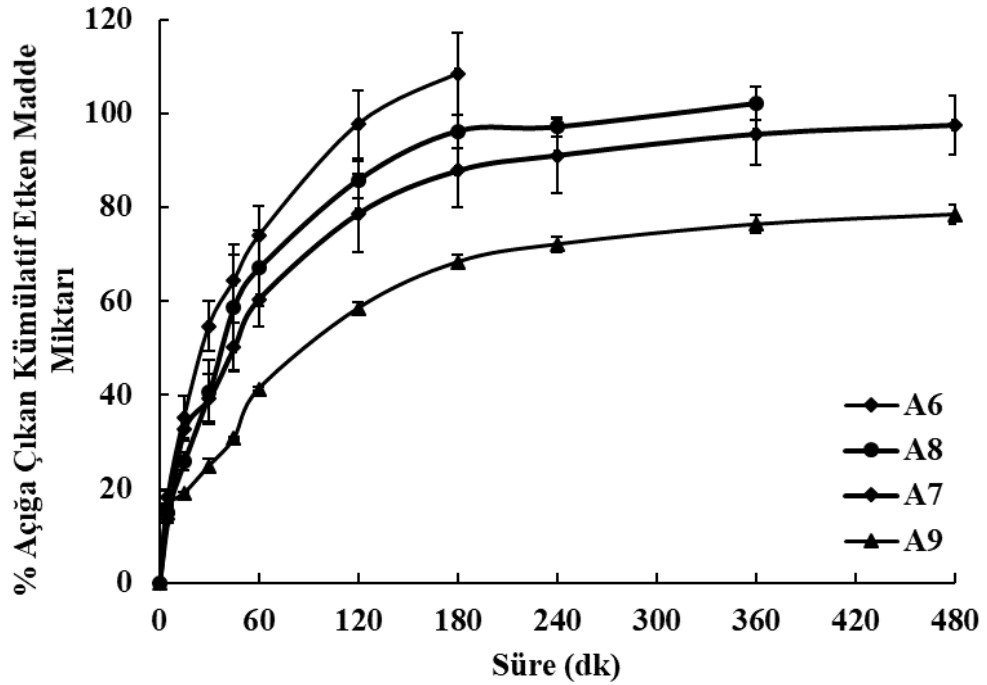
Şekil 3. 17. Orta molekül ağırlıklı kitozan çözeltisi kullanılan formülasyonlarda farklı etken madde:polimer oranlarının *in vitro* etken madde çözünme hızına etkisi ($n=3$)



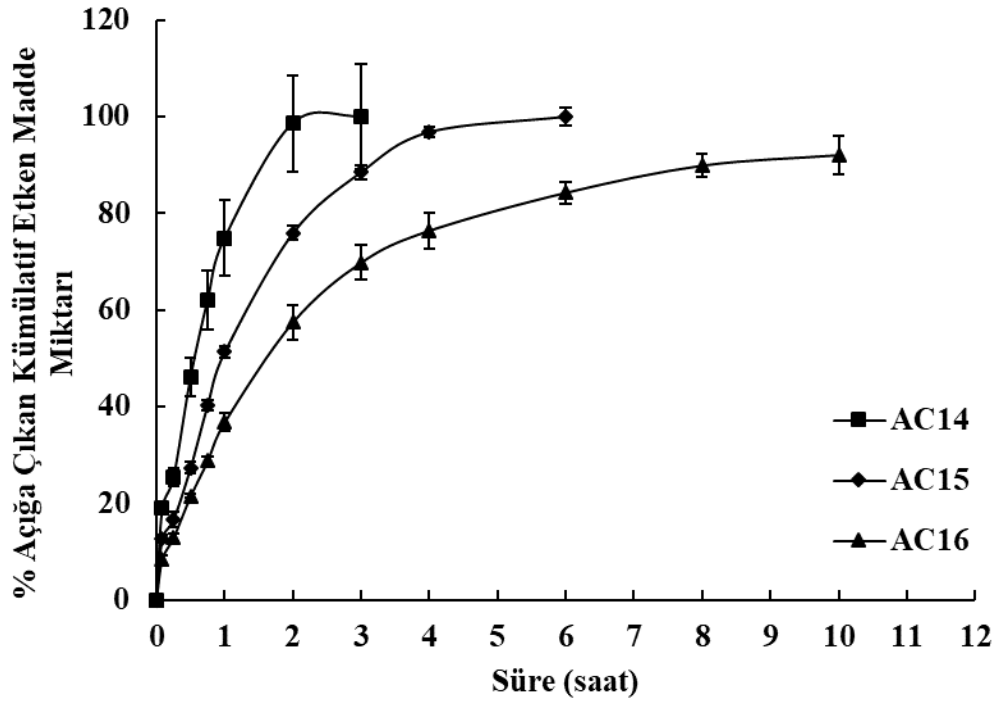
Şekil 3. 18. Aynı derişimdeki (% 1 (a/h)) farklı molekül ağırlıklı kitozan çözeltilerinin kullanıldığı formülasyonlarda *in vitro* etken madde çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)



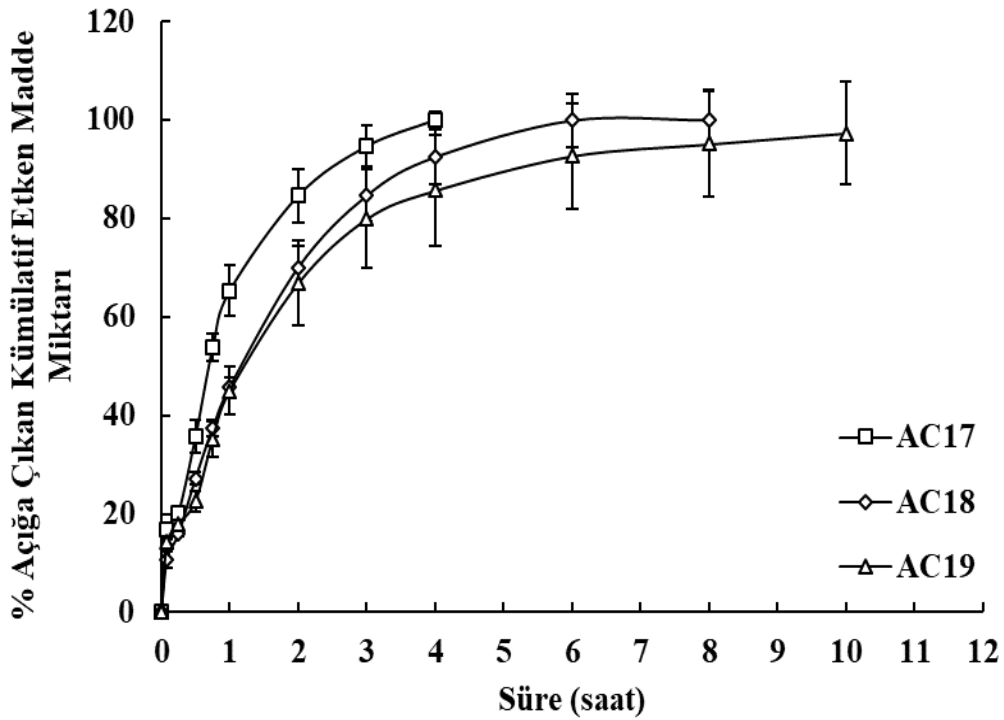
Şekil 3. 19. Düşük viskoziteli aljinat ile hazırlanan filmlerde etken madde:aljinat oranındaki artışın *in vitro* etken madde çözünme hızına etkisinin karşılaştırılması (n=3)



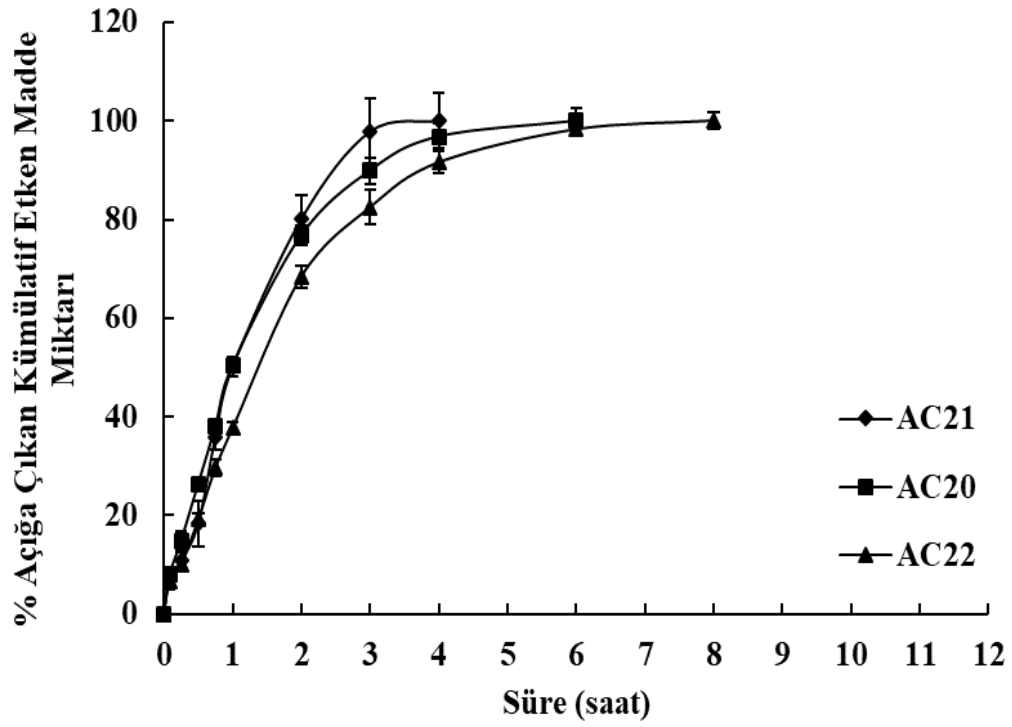
Şekil 3. 20. Orta viskoziteli aljinat ile hazırlanan filmlerde etken madde:aljinat oranındaki artışın *in vitro* etken madde çözünme hızına etkisinin karşılaştırılması (n=3)



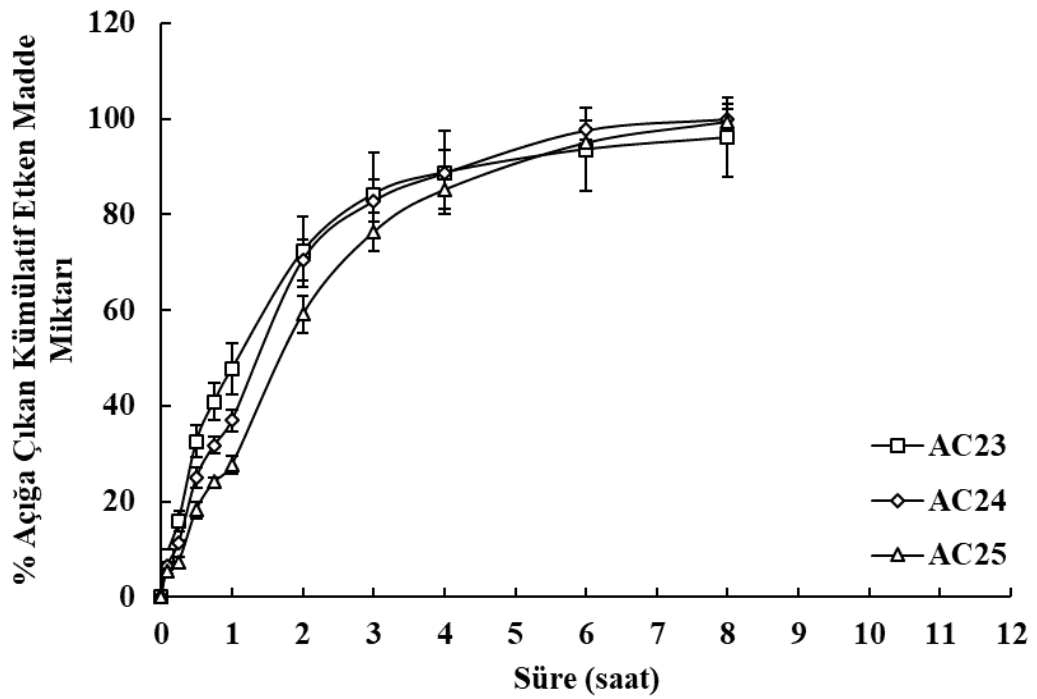
Şekil 3. 21. 15 mL orta molekül ağırlıklı kitozan, 5 mL aljinat çözeltisinin karıştırılması ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks filmlerde toplam polimer miktarındaki artışın *in vitro* etken madde çözünme hızına etkisi (n=3)



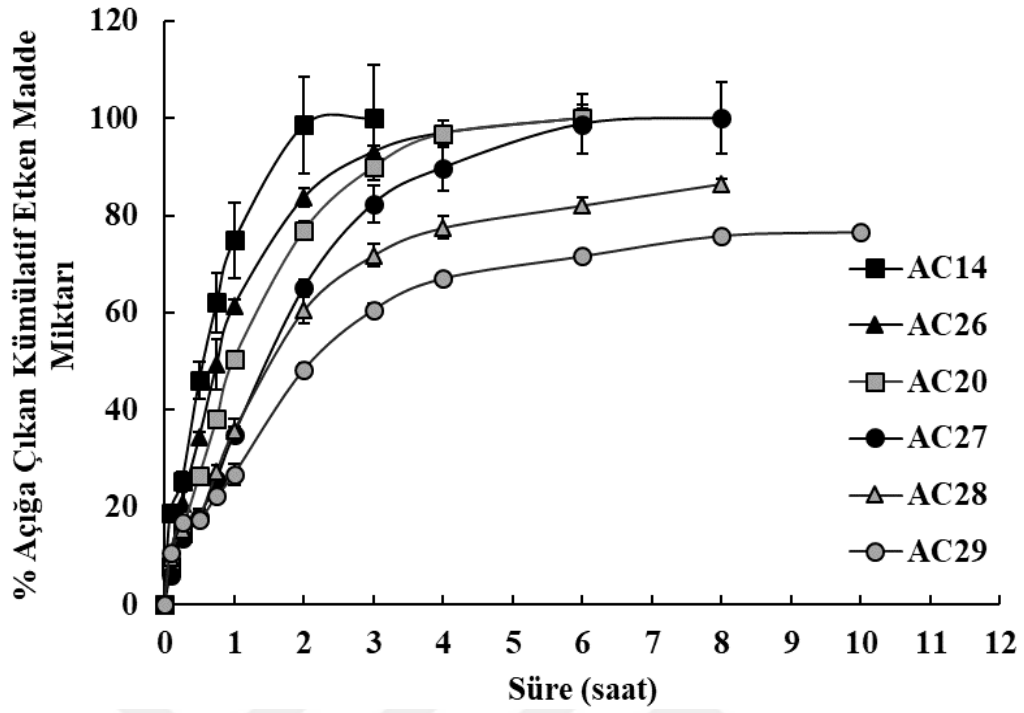
Şekil 3. 22. 15 mL düşük molekül ağırlıklı kitozan 5 mL aljinat çözeltisinin karıştırılması ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks filmlerde toplam polimer miktarındaki artışın *in vitro* etken madde çözünme hızına etkisi (n=3)



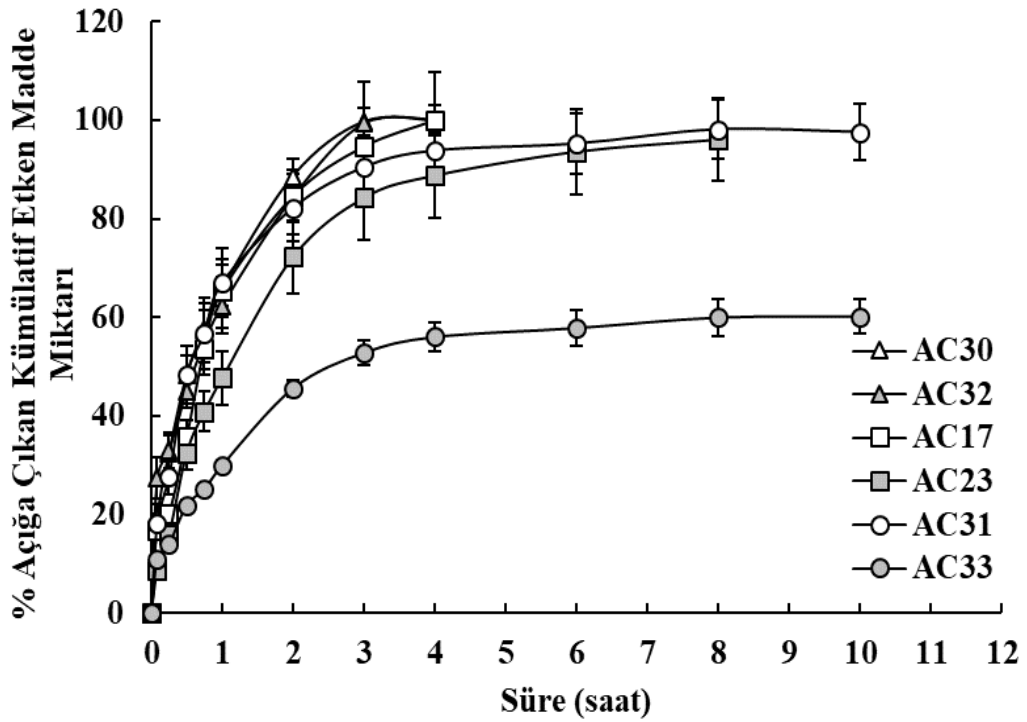
Şekil 3. 23. 15 mL aljinat 5 mL orta molekül ağırlıklı kitozan zltisinin karıştırılması ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks filmlerde toplam polimer miktarındaki artışın *in vitro* etken madde znme hızına etkisi ($n=3$)



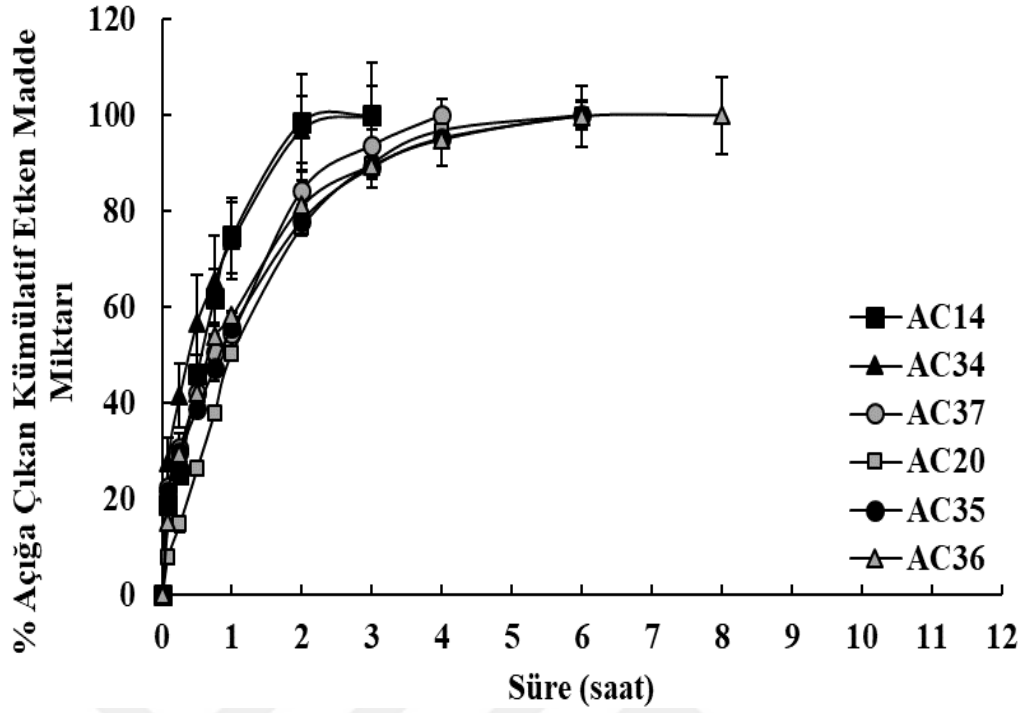
Şekil 3. 24. 15 mL aljinat 5 mL düşük molekül ağırlıklı kitozan zltisinin karıştırılması ile hazırlanan aljinat-kitozan kompleks filmlerde toplam polimer miktarındaki artışın *in vitro* etken madde znme hızına etkisi ($n=3$)



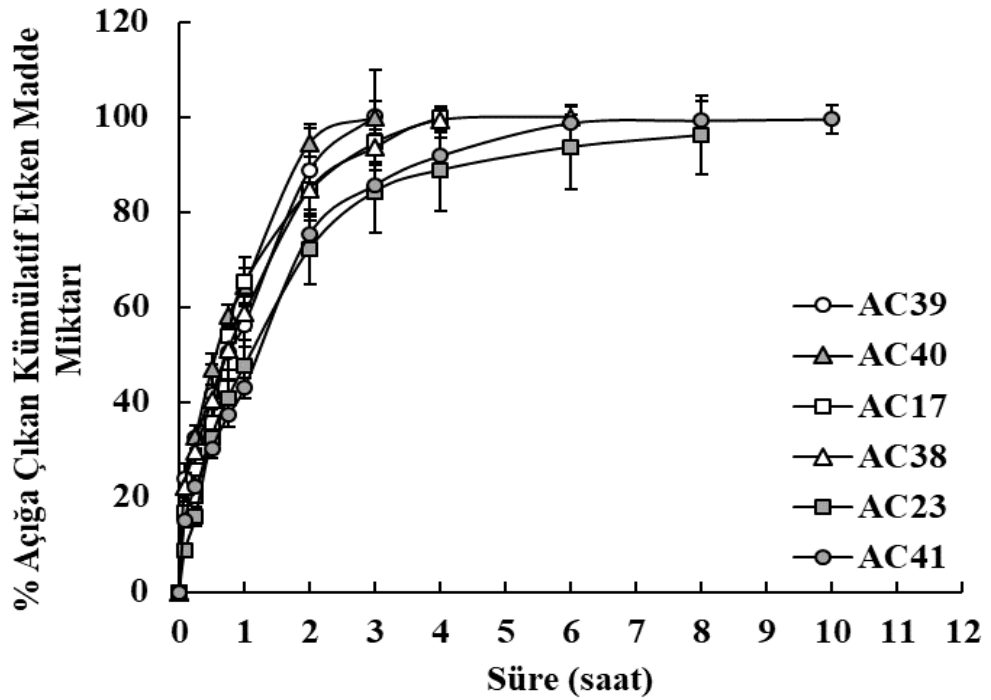
Şekil 3. 25. Orta molekül ağırlıklı kitozanın derişiminin sabit (% 1 (a/h)) tutulduğu aljinat-kitozan kompleks filmlerde karışma giren polimer hacimlerindeki değişimin *in vitro* etken madde çözünme hızlarına etkisinin karşılaştırılması ($n=3$)



Şekil 3. 26. Düşük molekül ağırlıklı kitozanın derişiminin sabit (% 1 (a/h)) tutulduğu aljinat-kitozan kompleks filmlerde karışma giren polimer hacimlerindeki değişimin *in vitro* etken madde çözünme hızlarına etkisinin karşılaştırılması ($n=3$)



Şekil 3. 27. Aljinat derişiminin sabit (% 1 (a/h)) tutulduğu orta molekül ağırlıklı kitozanın farklı oranlarda kullanıldığı aljinat-kitozan kompleks filmlerde karışma giren polimer hacimlerindeki değişimin *in vitro* etken madde çözünme hızlarına etkisi (n=3)



Şekil 3. 28. Aljinat derişiminin sabit (% 1 (a/h)) tutulduğu düşük molekül ağırlıklı kitozanın farklı oranlarda kullanıldığı aljinat-kitozan kompleks filmlerde karışma giren polimer hacimlerindeki değişimin *in vitro* etken madde çözünme hızlarına etkisi (n=3)

3.3.4.1. Kompleks Film Formülasyonlarının *In vitro* Salım Kinetiklerine Ait Bulgular

In vitro çözünme hızı çalışmalarından hareketle hesaplanmış olan kinetik parametreleri Çizelge 3.13-Çizelge 3.16 ile gösterilmiştir.

Çizelge 3. 13. AC14-AC20 formülasyonlarına ait *in vitro* salım kinetikleri

Kinetik modeller	AC14	AC15	AC16	AC17	AC18	AC19	AC20	
Sıfır derece	k_0	43,64	22,50	12,33	31,84	13,41	17,24	22,54
	r^2	0,878	0,882	0,867	0,888	0,836	0,860	0,886
	RSS	3946	4535	5406	3949	8120	6340	4371
	SH	6,648	2,911	1,530	4,274	1,875	2,320	2,695
Higuchi	k_H	64,87	46,44	33,50	54,89	36,89	41,70	46,34
	r^2	0,988	0,988	0,986	0,990	0,976	0,984	0,985
	RSS	383,2	471,5	583,1	355,9	1179,4	737,8	580,2
	SH	2,902	1,831	1,280	2,095	1,820	1,790	2,031
Korsmeyer-Peppas	k	1,822	1,655	1,545	1,726	1,581	1,632	1,669
	n	0,546	0,571	0,622	0,517	0,448	0,598	0,743
	r^2	0,933	0,933	0,983	0,873	0,877	0,970	0,987
	RSS	0,011	0,018	0,008	0,020	0,021	0,008	0,005
	SH	0,104	0,089	0,042	0,140	0,097	0,060	0,049

Çizelge 3. 14. AC21-AC27 formülasyonlarına ait *in vitro* salım kinetikleri

Kinetik modeller	AC21	AC22	AC23	AC24	AC25	AC26	AC27	
Sıfır derece	k_0	30,54	16,91	16,67	16,86	16,13	23,26	16,78
	r^2	0,951	0,884	0,836	0,878	0,914	0,843	0,893
	RSS	1483	4923	7147	5186	3215	6762	4405
	SH	2,620	2,044	2,463	2,098	1,652	3,555	1,934
Higuchi	k_H	50,44	40,26	40,77	40,34	37,79	48,90	39,77
	r^2	0,973	0,980	0,977	0,982	0,981	0,979	0,981
	RSS	815,5	856,5	982,4	750,6	714,1	912,9	790,7
	SH	3,171	1,929	2,066	1,806	1,761	2,548	1,853
Korsmeyer-Peppas	k	1,611	1,560	1,690	1,578	1,476	1,781	1,541
	n	0,788	0,758	0,716	0,740	0,774	0,761	0,728
	r^2	0,919	0,967	0,986	0,978	0,956	0,999	0,984
	RSS	0,041	0,023	0,005	0,009	0,033	0,000	0,010
	SH	0,135	0,070	0,490	0,063	0,083	0,013	0,047

Çizelge 3. 15. AC28-AC34 formülasyonlarına ait *in vitro* salım kinetikleri

Kinetik modeller	AC28	AC29	AC30	AC31	AC32	AC33	AC34	
Sıfır derece	k_0	14,52	10,42	33,00	11,92	32,51	8,52	44,23
	r^2	0,871	0,86	0,858	0,731	0,863	0,802	0,834
	RSS	4100	4083	5576	19568	5177	4144	5793
	SH	1,866	1,33	5,079	2,178	4,894	1,34	8,055
Higuchi	k_H	34,91	28,36	57,82	37,63	56,81	23,81	67,27
	r^2	0,983	0,982	0,988	0,926	0,989	0,965	0,983
	RSS	525,9	526,7	490,0	5423,5	434,7	733,7	593,6
	SH	1,511	1,217	2,458	3,219	2,315	1,436	3,612
Korsmeyer-Peppas	k	1,537	1,483	1,824	1,817	1,772	1,461	1,869
	n	0,566	0,479	0,503	0,534	0,338	0,399	0,398
	r^2	0,945	0,926	0,999	0,975	0,953	0,961	0,997
	RSS	0,022	0,031	0,000	0,004	0,004	0,028	0,000
SH	0,068	0,060	0,011	0,061	0,044	0,027	0,022	

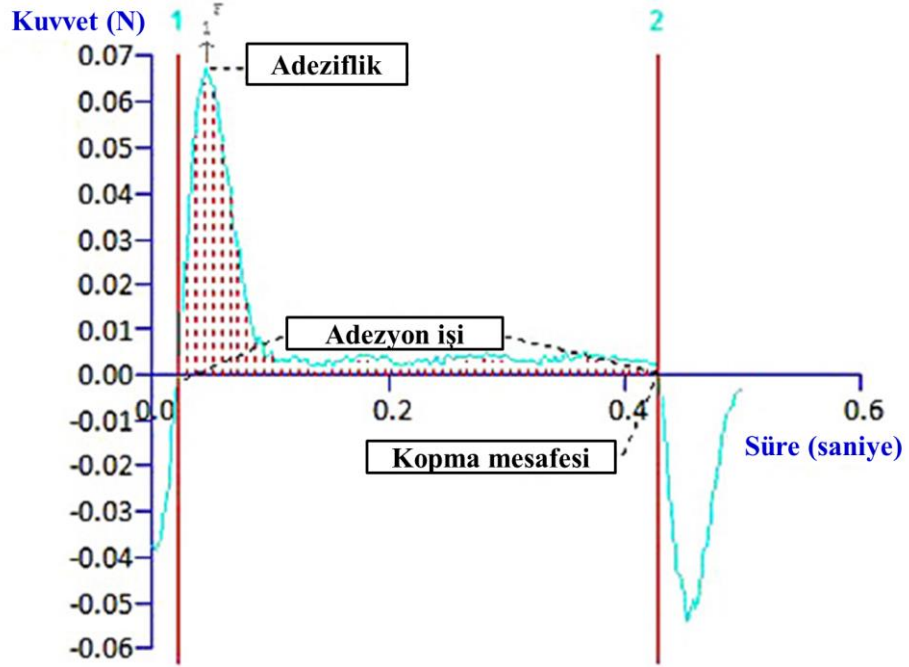
Çizelge 3. 16. AC35-AC41 formülasyonlarına ait *in vitro* salım kinetikleri

Kinetik modeller	AC35	AC36	AC37	AC38	AC39	AC40	AC41	
Sıfır derece	k_0	22,79	17,87	31,52	23,54	40,50	42,38	11,88
	r^2	0,841	0,791	0,885	0,826	0,906	0,884	0,803
	RSS	6579	11015	3999	7825	2546	3520	12981
	SH	3,306	3,058	4,301	3,824	5,34	6,279	1,774
Higuchi	k_H	48,08	44,61	54,54	49,96	59,52	63,00	36,49
	r^2	0,984	0,964	0,994	0,978	0,996	0,995	0,961
	RSS	661,2	1880,6	215,9	994,7	95,0	151,5	2585,2
	SH	2,168	2,858	1,632	2,659	1,445	1,825	2,222
Korsmeyer-Peppas	k	1,722	4,116	1,736	1,747	1,738	1,807	1,621
	n	0,374	1,27	0,37	0,396	0,345	0,441	0,425
	r^2	0,982	0,995	0,988	0,976	0,989	0,992	0,994
	RSS	0,002	0,006	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001
SH	0,029	0,051	0,024	0,036	0,021	0,022	0,019	

3.3.5. Kompleks Filmlerin *In vitro* Adezif Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular

Kompleks filmlerin adezif özelliklerini açıklayabilmek için tekstür analiz cihazı ile mukoadesyon testi sonucunda elde edilen grafikten hareketle adezyon işi ve kopma

kuvveti hesaplanmıştır (Şekil 3.29). Adezyon testine ait sonuçlar Çizelge 3.17 ile gösterilmiştir.



Şekil 3. 29. Tekstür analiz cihazı ile mukoadezyon testi sonucunda elde edilen eğri

Çizelge 3. 17. Aljinat-kitozan kompleks film formülasyonlarının adezyon testi sonuçları ($n=3$)

Formülasyon	Kopma kuvveti (N) \pm SS	Adezyon işi (N.mm) \pm SS
AC14	0,884 \pm 0,351	0,072 \pm 0,023
AC15	0,454 \pm 0,118	0,039 \pm 0,013
AC16	0,080 \pm 0,016	0,015 \pm 0,004
AC17	0,605 \pm 0,074	0,040 \pm 0,012
AC18	0,189 \pm 0,018	0,020 \pm 0,009
AC19	0,110 \pm 0,024	0,007 \pm 0,003
AC20	2,601 \pm 1,553	0,187 \pm 0,092
AC21	0,468 \pm 0,120	0,062 \pm 0,013
AC22	0,843 \pm 0,075	0,063 \pm 0,017
AC23	1,131 \pm 0,123	0,089 \pm 0,033
AC24	1,048 \pm 0,290	0,082 \pm 0,027
AC25	1,774 \pm 0,315	0,180 \pm 0,027
AC26	1,275 \pm 0,468	0,086 \pm 0,041
AC27	0,243 \pm 0,038	0,013 \pm 0,003
AC28	0,859 \pm 0,315	0,084 \pm 0,025
AC29	0,921 \pm 0,264	0,083 \pm 0,041
AC30	0,270 \pm 0,008	0,036 \pm 0,009
AC31	0,029 \pm 0,011	0,011 \pm 0,007
AC32	1,047 \pm 0,330	0,097 \pm 0,049
AC33	1,530 \pm 0,408	0,127 \pm 0,047
AC34	0,579 \pm 0,478	0,109 \pm 0,086
AC35	0,896 \pm 0,658	0,045 \pm 0,078
AC36	0,722 \pm 0,189	0,197 \pm 0,051
AC37	0,497 \pm 0,125	0,104 \pm 0,020
AC38	0,240 \pm 0,137	0,079 \pm 0,041
AC39	0,349 \pm 0,060	0,089 \pm 0,025
AC40	1,113 \pm 0,032	0,101 \pm 0,029
AC41	0,162 \pm 0,014	0,016 \pm 0,001

3.3.6. Kompleks Film Formülasyonlarının Görüntülenmesine Ait Bulgular

Film formülasyonları Bölüm 2.2.4.10' da anlatıldığı şekilde üç farklı yöntemle görüntülenmiştir.

3.3.6.1. Filmlerin Optik Mikroskopla Görüntülenmesine Ait Bulgular

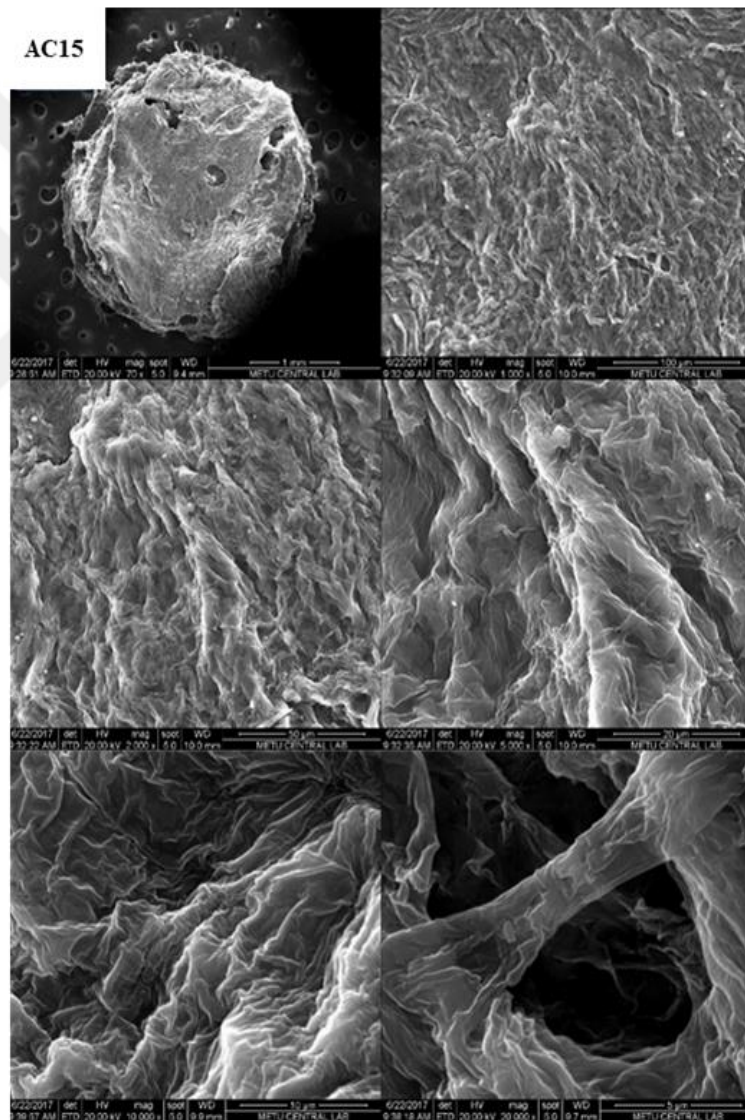
Kompleks filmleri oluşturmak için hazırlanmış olan jeller mikroskop altında görüntülenmiş, kurumuş filmlerin görüntüleri ise fotoğraf makinesi ile alınmıştır (Şekil 3.30).

Jellerin mikroskop görüntüleri (X10)	Filmlerin fotoğrafları	Jellerin mikroskop görüntüleri (X10)	Filmlerin fotoğrafları
AC14		AC20	
AC15		AC21	
AC16		AC22	
AC26		AC28	
AC27		AC29	
AC17		AC23	
AC18		AC24	
AC19		AC25	
AC32		AC33	

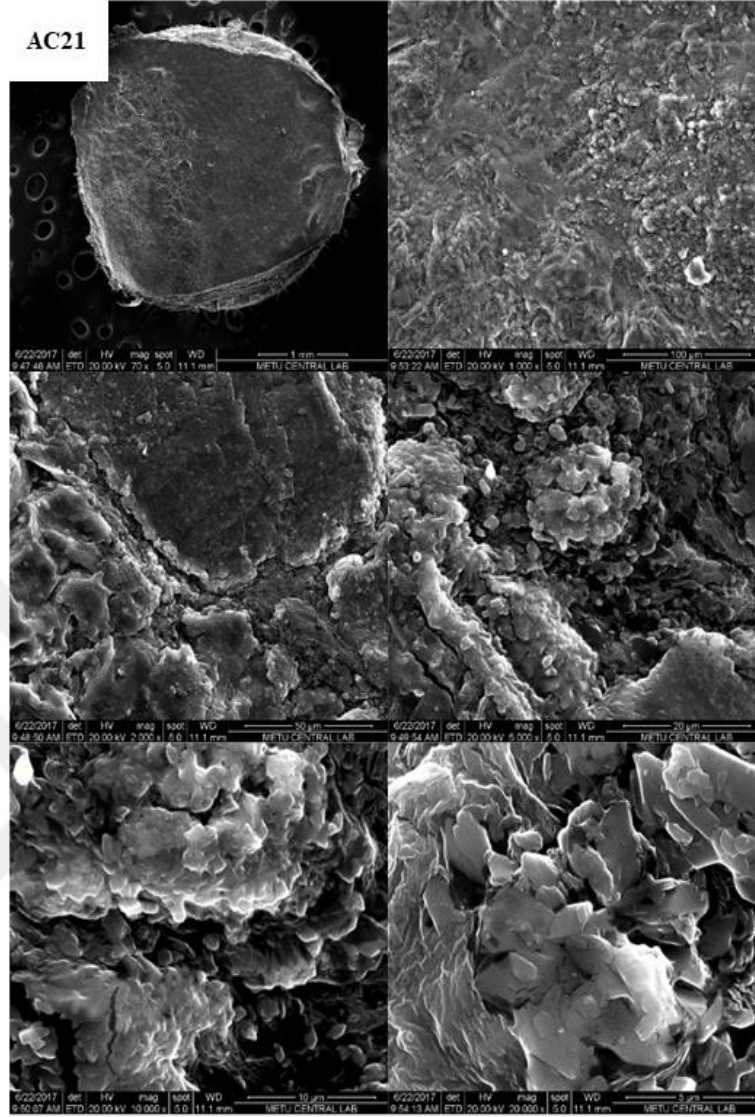
Şekil 3. 30. Aljinat-kitozan kompleks film formülasyonlarına ait optik mikroskop görüntüleri (Kilicarslan ve ark., 2018)

3.3.6.2. Filmlerin SEM ile Görüntülenmesine Ait Bulgular

Film formülasyonlarında aynı derişimde (% 2) polimer çözeltilerinin farklı hacimlerde karıştırılarak hazırlanan, AC15 (5 mL % 2 aljinat ve 15 mL % 2 orta molekül ağırlıklı kitozan) ve AC21 (15 mL % 2 aljinat ve 5 mL % 2 orta molekül ağırlıklı kitozan) formülasyonlarının SEM analizi ile elde edilmiş görüntüleri (Şekil 3.31 ve Şekil 3.32) incelenerek hacim değişiminin kompleks oluşumuna etkisi incelenmiştir.



Şekil 3. 31. AC15 (5 mL % 2 aljinat ve 15 mL % 2 orta molekül ağırlıklı kitozan) kompleks film formülasyonuna ait SEM görüntüsü

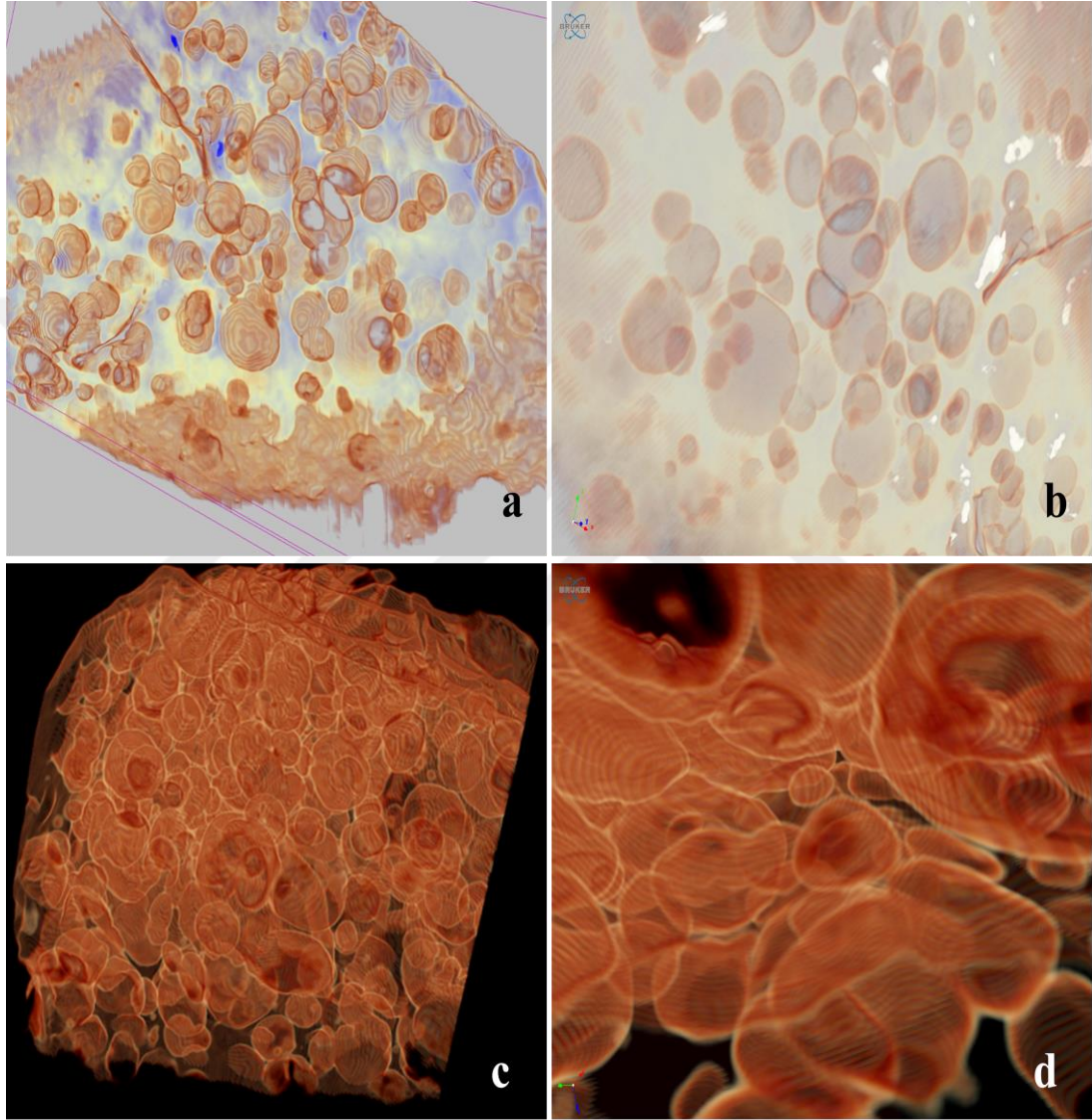


Şekil 3. 32. AC21 (15 mL % 2 aljinat ve 5 mL % 2 orta molekül ağırlıklı kitozan) formülasyonuna ait SEM görüntüsü

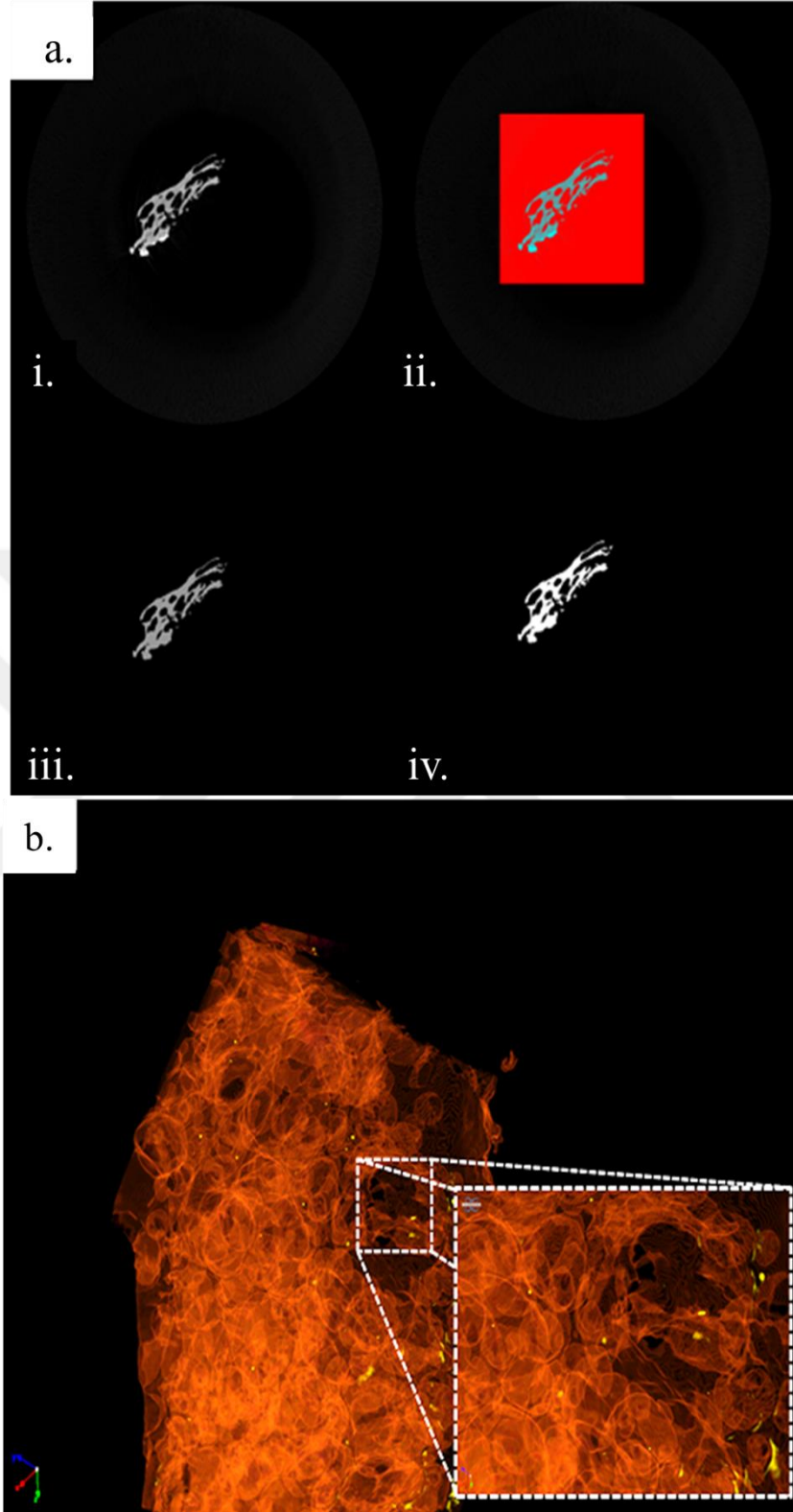
3.3.6.3. Filmlerin Mikro-BT ile Görüntülenmesine Ait Bulgular

Film formülasyonlarında aynı derişimde (% 2) polimer çözeltilerinin farklı hacimlerde karıştırılarak hazırlanan, AC15 (5 mL % 2 aljinat ve 15 mL % 2 orta molekül ağırlıklı kitozan), AC18 (5 mL % 2 aljinat ve 15 mL % 2 düşük molekül ağırlıklı kitozan) ve AC21 (15 mL % 2 aljinat ve 5 mL % 2 orta molekül ağırlıklı kitozan) formülasyonlarının ve farklı derişimde polimer çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlanan AC33 (15 mL % 3 aljinat ve 15 mL % 1 düşük molekül ağırlıklı kitozan)

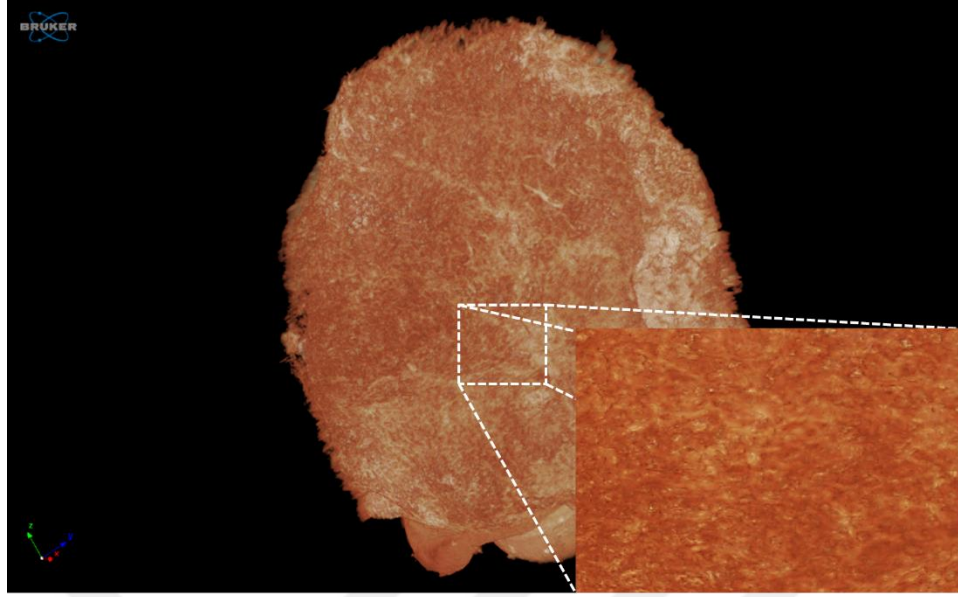
kompleks film formülasyonunun mikro-BT ile 3 boyutlu görüntüleri alınmış ve filmlerin toplam hacmi, koaservat hacmi, film yapısına ve koaservatlara ait SMI değeri gibi özellikleri incelenerek analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.33 - Şekil 3.35). Formülasyonlara ait analiz sonuçları Çizelge 3.18 ile gösterilmiştir.



Şekil 3. 33. AC 15 (a ve b) ve AC18 (c ve d) formülasyonlarına ait 3D Mikro-BT görüntüleri (Kilicarslan ve ark., 2020).



Şekil 3. 34. AC21 kompleks film formülasyonunun Mikro-BT ile görüntülenmesi: film örneğinin aksenal dilimi (a), tüm numuneleri içeren ROI seçimi (a.i ve a.ii), görüntünün gri seviye histogramı ile binarize edilmesi (a.iii), analiz için eşikleme (a.iv), tüm ayarlamalardan sonra 3D Mikro-BT görüntüleri (b) (Kilicarslan ve ark., 2018)



Şekil 3. 35. AC33 film formülasyonuna ait Mikro-BT görüntüsü

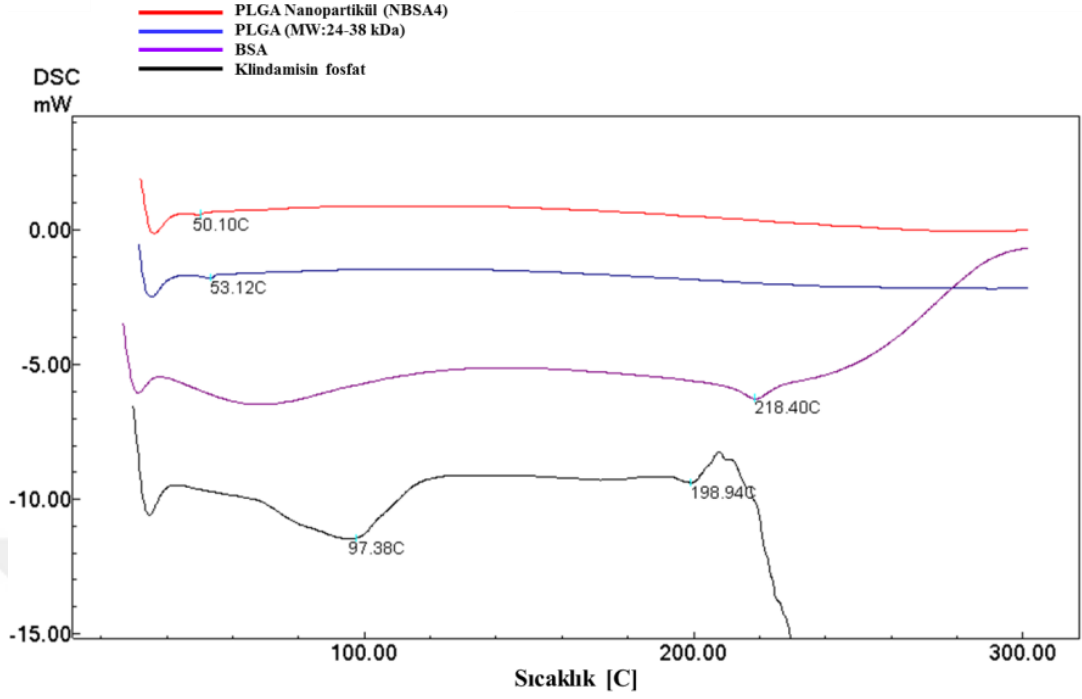
Çizelge 3. 18. Aljinat-kitozan kompleks filmler için seçilmiş mikro-BT analiz parametreleri

	TV (mm ³)	Obj.V (mm ³)	Obj.V/TV (%)	SMI	Koaservat çapı			
					Film	Koaservat	En az	En yüksek
AC15	536	33,2	6,19	0,20	1,23	305 µm	1134 µm	682 µm
AC18	815	79,6	9,76	0,14	1,28	180 µm	389 µm	224 µm
AC21	233	19,8	8,51	0,03	1,75	93,0µm	395µm	289 µm
AC33	667	254	38,1	0,21	1,65	147 µm	444 µm	289 µm

3.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular

3.4.1. Nanopartikül Formülasyonlarında DSC Analizine Ait Bulgular

Klindamisin fosfat, BSA, PLGA ve NBSA4 (BSA ve klindamisin fosfat içeren nanopartikül) formülasyonuna ait DSC termogramları Şekil 3.36 ile gösterilmiştir.



Şekil 3. 36. Nanopartikül, PLGA ve etken maddelere ait DSC termogramı

3.4.2. Nanopartikül Formülasyonlarında Partikül büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Bulguları

Partiküllerin boyut, polidisperite indeksi ve zeta potansiyeli Bölüm 2.2.5.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçları Çizelge 3.19 ile gösterilmiştir. Nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonları için hazırlanmış nanopartiküllere ait veriler de NG1 ve NG2 formülasyon kodları ile ifade edilmiştir.

Çizelge 3. 19. Nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri ($n=6$)

Formülasyon	Partikül büyüklüğü (nm) \pm SS	Polidispersite indeksi PDI \pm SS	Zeta potansiyel (mV) \pm SS
N1	564,8 \pm 49,04	0,579 \pm 0,072	-14,67 \pm 0,058
N2	2018,1 \pm 432,1	0,812 \pm 0,118	-7,020 \pm 0,542
N2-2	461,4 \pm 3,971	0,359 \pm 0,019	-9,903 \pm 0,182
N3	608,3 \pm 213,6	0,503 \pm 0,116	-13,36 \pm 7,482
N4	550,9 \pm 142,8	0,552 \pm 0,090	-12,34 \pm 6,956
N5	359,8 \pm 71,20	0,461 \pm 0,055	-15,86 \pm 2,618
N6	709,5 \pm 80,40	0,547 \pm 0,071	-4,183 \pm 1,509
N7	396,0 \pm 94,21	0,480 \pm 0,068	-15,97 \pm 2,233
N8	822,4 \pm 58,88	0,636 \pm 0,033	-33,42 \pm 3,446
N9	1176,3 \pm 123,4	0,470 \pm 0,023	-7,830 \pm 2,064
N10	1105,2 \pm 423,6	0,418 \pm 0,159	-21,07 \pm 0,582
N11	551,0 \pm 67,11	0,331 \pm 0,037	-25,53 \pm 2,645
N12	286,6 \pm 8,895	0,351 \pm 0,031	-16,57 \pm 0,153
N13	965,7 \pm 2,578	0,851 \pm 0,124	-18,94 \pm 3,548
N14	1987,0 \pm 172,6	0,709 \pm 0,097	-7,080 \pm 0,533
N15	516,5 \pm 32,06	0,594 \pm 0,048	-10,24 \pm 0,160
N16	1489,3 \pm 131,6	0,631 \pm 0,019	-24,23 \pm 2,503
N17	540,8 \pm 139,4	0,710 \pm 0,078	-22,64 \pm 1,040
N18	5066,8 \pm 945,7	0,521 \pm 0,102	-25,17 \pm 0,351
N19	378,9 \pm 10,39	0,360 \pm 0,038	-2,157 \pm 0,255
N20	364,6 \pm 52,22	0,462 \pm 0,008	-16,90 \pm 2,100
N21	2297,5 \pm 141,4	0,382 \pm 0,140	-11,40 \pm 0,369
N22	734,0 \pm 167,3	0,646 \pm 0,088	-19,47 \pm 0,666
N23	412,4 \pm 78,64	0,538 \pm 0,128	-7,890 \pm 0,551
N24	1094,0 \pm 162,5	0,423 \pm 0,014	-12,57 \pm 0,289
N25	445,2 \pm 16,90	0,518 \pm 0,032	-30,03 \pm 1,436
N26	420,1 \pm 82,35	0,403 \pm 0,079	-16,57 \pm 2,926
N27	2153,2 \pm 66,28	0,420 \pm 0,014	-7,777 \pm 0,250
N28	1199,1 \pm 85,04	0,376 \pm 0,046	-23,57 \pm 0,643
N29	1344,8 \pm 72,15	0,540 \pm 0,082	-23,81 \pm 0,218
N30	2445,3 \pm 225,0	0,600 \pm 0,066	32,00 \pm 0,400
N31	589,8 \pm 89,51	0,342 \pm 0,186	-20,63 \pm 0,603
N32	616,7 \pm 50,83	0,414 \pm 0,036	-15,83 \pm 0,208
N33	571,9 \pm 34,21	0,254 \pm 0,054	-28,07 \pm 0,252
N34	602,3 \pm 22,81	0,315 \pm 0,021	-23,11 \pm 0,185
NBSA1	834,0 \pm 189,5	0,509 \pm 0,245	-27,57 \pm 0,643
NBSA2	917,9 \pm 391,5	0,718 \pm 0,238	-10,75 \pm 0,979
NBSA3	449,6 \pm 192,3	0,495 \pm 0,181	-18,87 \pm 0,874
NBSA4	790,9 \pm 24,84	0,502 \pm 0,085	-22,60 \pm 0,100
NG1	547,0 \pm 318,3	0,334 \pm 0,065	-24,23 \pm 2,503
NG2	421,6 \pm 11,35	0,518 \pm 0,082	-18,60 \pm 1,997

3.4.3. Nanopartiküllerin % Verim ve % İşlem Etkinliği Ait Bulgular

Nanopartiküllerde işlem etkinliği ve yükleme kapasitesi tayini Bölüm 2.2.5.4 ile açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.20 ve Çizelge 3.21).

Çizelge 3. 20. Klindamisin fosfat yüklü nanopartiküllerin % verimi ve klindamisin fosfat için işlem etkinliği (% İE) ($n=3$)

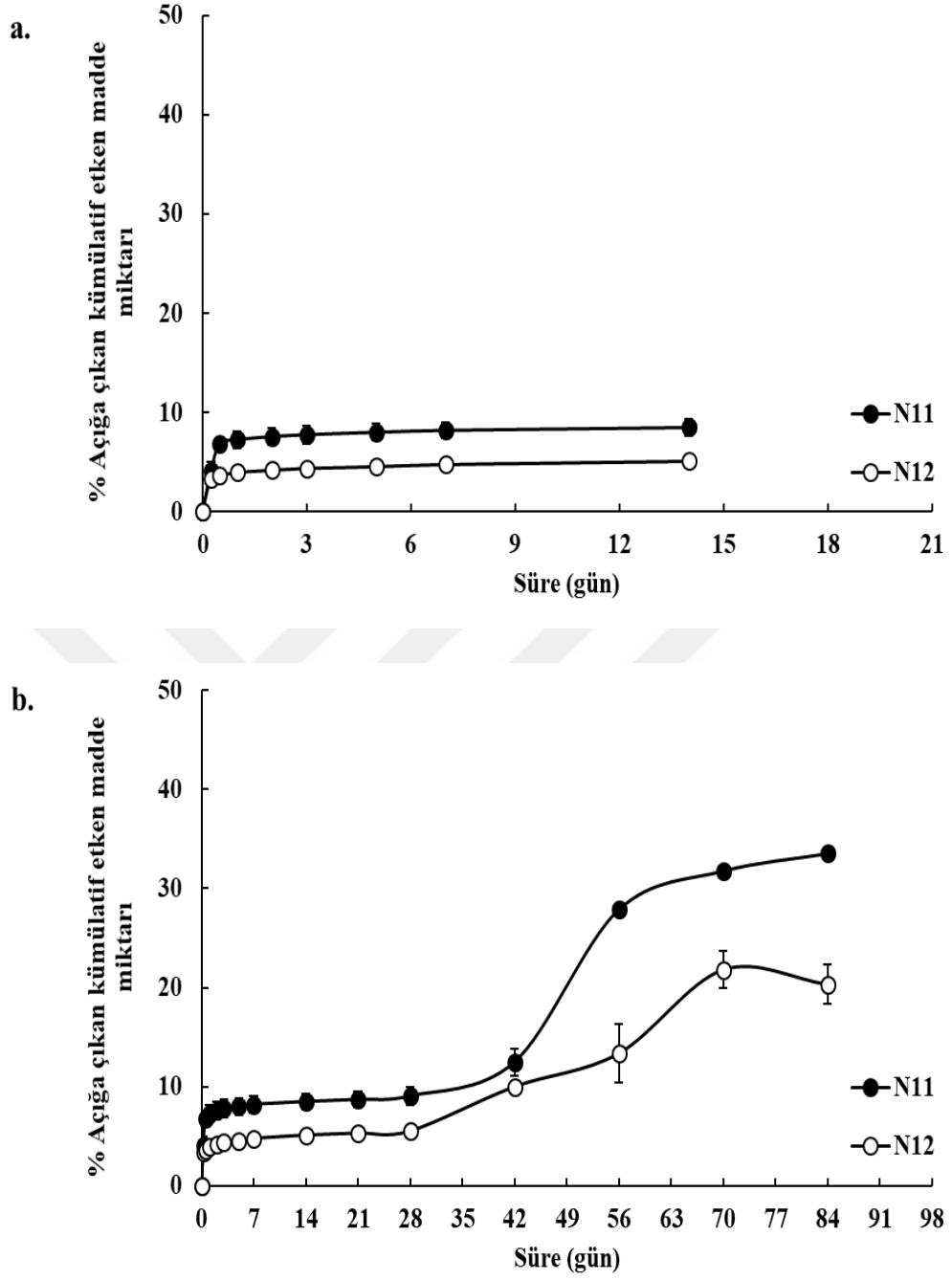
Formülasyon	% Verim	% İşlem etkinliği (% İE) \pm SS
N1	73,67	9,888 \pm 1,473
N2	74,33	21,68 \pm 1,040
N2-2	47,33	13,60 \pm 0,503
N3	57,58	18,53 \pm 0,800
N4	59,83	19,03 \pm 0,464
N5	41,50	2,611 \pm 4,345
N6	74,58	27,83 \pm 0,095
N7	55,00	21,01 \pm 0,036
N8	64,17	12,87 \pm 0,128
N9	62,14	13,78 \pm 0,251
N10	80,58	17,19 \pm 0,038
N11	83,50	32,51 \pm 1,329
N12	61,25	31,26 \pm 0,395
N13	59,41	15,15 \pm 2,090
N14	78,08	20,03 \pm 0,441
N15	51,83	19,02 \pm 6,141
N16	72,58	8,718 \pm 1,777
N17	73,50	44,89 \pm 0,304
N18	61,36	22,82 \pm 1,116
N19	69,07	20,26 \pm 3,613
N20	74,92	18,05 \pm 3,583
N21	73,77	15,49 \pm 1,844
N22	65,17	9,560 \pm 1,856
N23	74,33	16,79 \pm 1,121
N24	66,50	15,24 \pm 0,629
N25	70,25	28,13 \pm 0,251
N26	38,67	15,86 \pm 0,590
N27	77,00	29,91 \pm 0,594
N28	52,33	9,609 \pm 0,214
N29	72,17	32,61 \pm 0,716
N30	77,00	16,17 \pm 0,379
N32	78,70	23,77 \pm 3,247
N34	73,67	42,48 \pm 0,566
NBSA2	77,14	31,09 \pm 3,468
NBSA4	67,70	44,78 \pm 0,949
NG2	81,42	33,97 \pm 0,326

Çizelge 3. 21. BMP veya BSA yüklü nanopartiküllerin % verimi ve BMP-7 ve BSA için işlem etkinliği (%İE) ($n=3$)

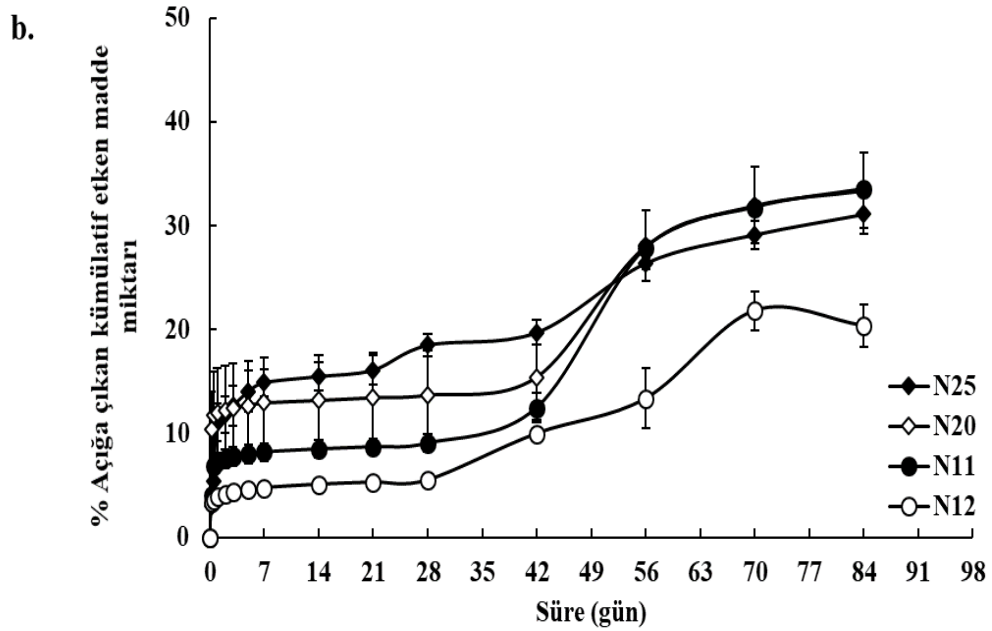
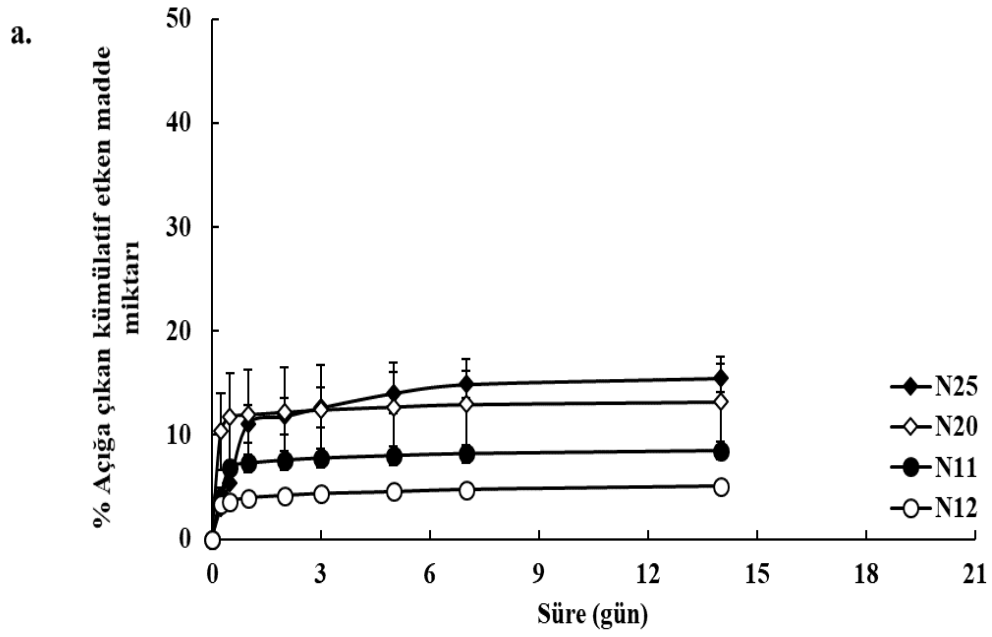
Formülasyon	% Verim	% İşlem Etkinliği (%İE) \pm SS
N31	65,33	68,91 \pm 7,771
N32	78,70	77,80 \pm 8,720
N33	71,96	64,15 \pm 5,490
N34	73,67	68,37 \pm 8,055
NBSA1	60,10	51,25 \pm 9,872
NBSA2	77,14	72,88 \pm 5,364
NBSA3	62,08	60,17 \pm 11,472
NBSA4	67,70	68,23 \pm 13,98
NG1	73,18	74,67 \pm 6,671
NG2	81,42	79,33 \pm 10,51

3.4.4. Nanopartiküllerin *In vitro* Çözünme Hızı Deneyine Ait Bulgular

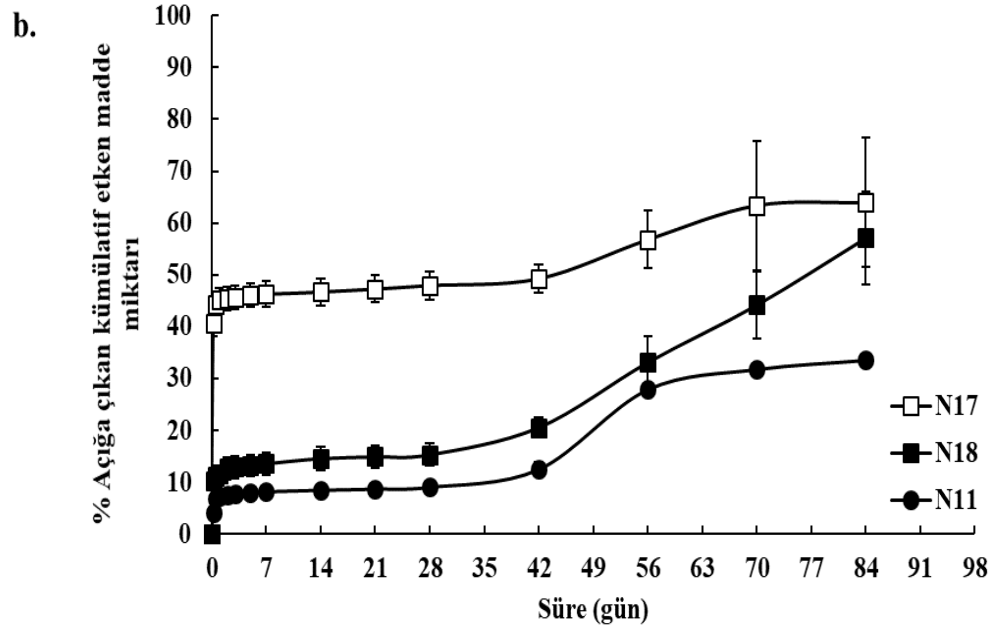
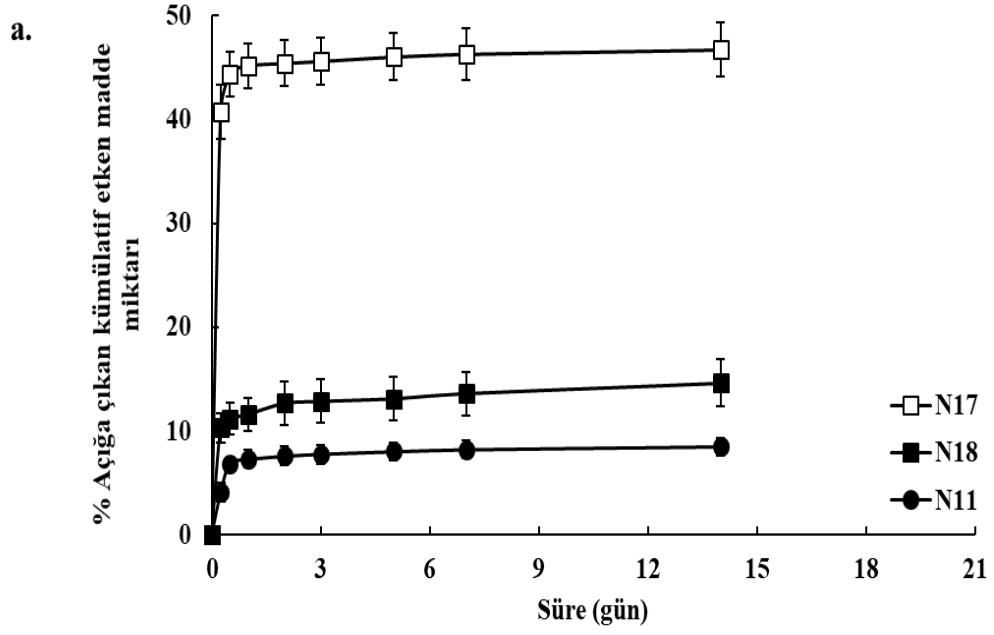
Nanopartikül formülasyonlarında *in vitro* etken madde çözünme hızı deneyleri Bölüm 2.2.5.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar grafikler halinde ikinci hafta ve üçüncü ay verileri olarak gösterilmiştir. Şekil 3.37 - Şekil 3.41 ile verilen çözünme hızı profilleri klindamisin fosfata, Şekil 3.42 ile verilen profil ise BSA'ya aittir. Şekil 3.43 ile de hem BSA hem de klindamisin fosfat yüklü nanopartikülden her iki etken maddenin de *in vitro* çözünme hızı profilleri gösterilmiştir.



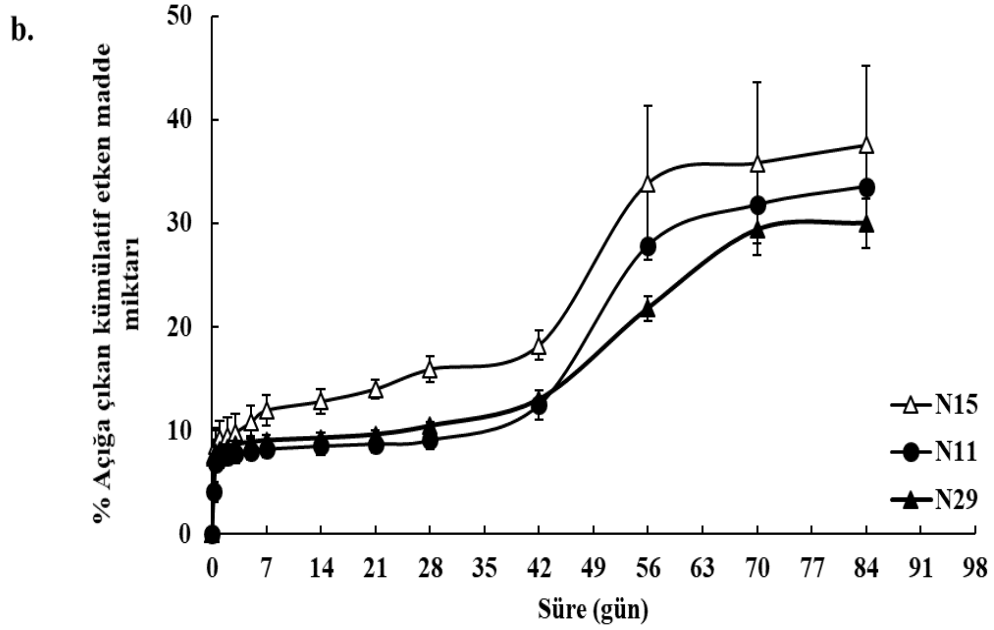
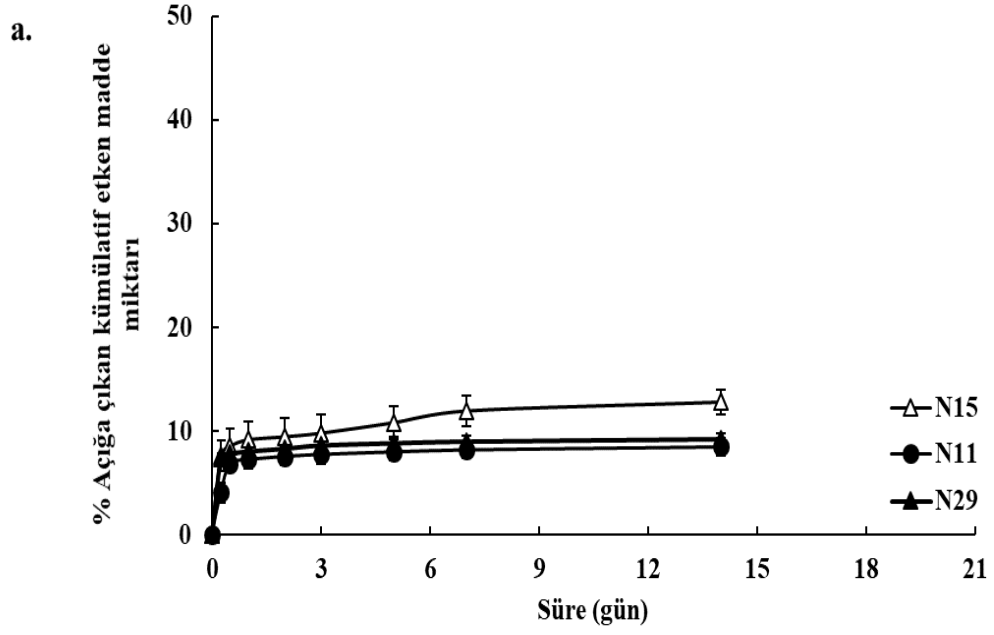
Şekil 3. 37. N11 (ana formülasyon) ve N12 (iç su fazının 0,5 mL'ye düşürüldüğü formülasyon) formülasyonlarına ait *in vitro* klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)) ($n=3$)



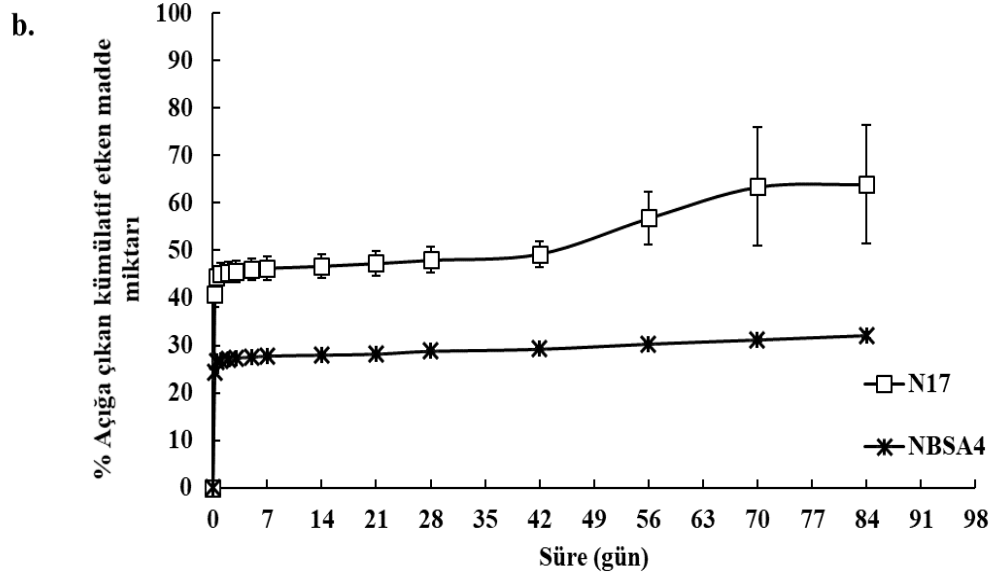
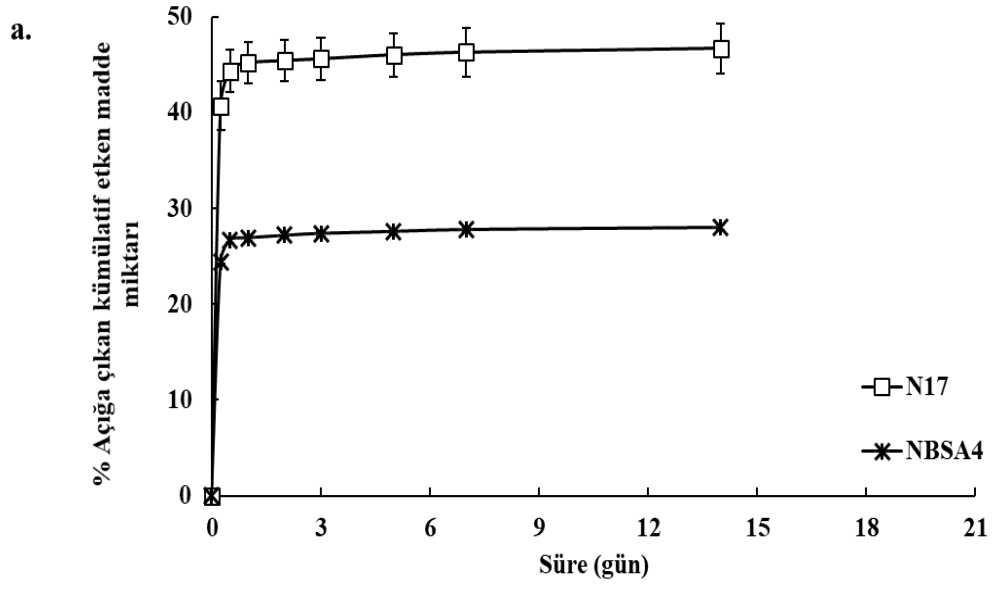
Şekil 3. 38. İç su fazının değiştirilmesi ile hazırlanmış formülasyonlara ait *in vitro* klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)). (N11 (ana formülasyon), N12 (iç su fazı 0,5 mL), N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılan formülasyon) ve N25 (klindamisin fosfatın metanolde dağıtıldığı formülasyon)) ($n=3$)



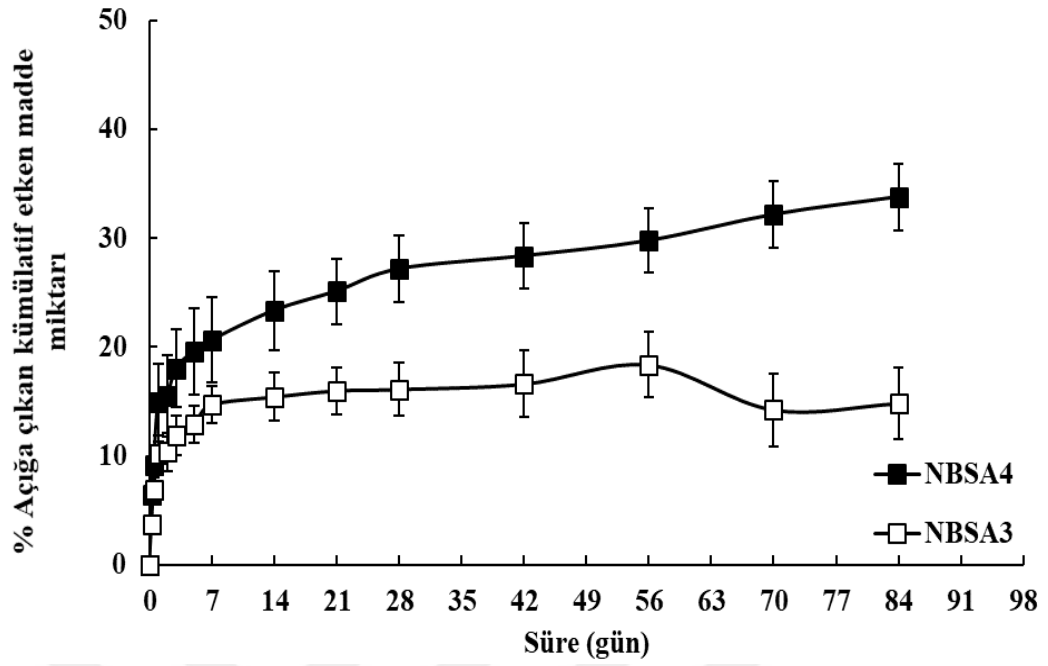
Şekil 3. 39. Dış su fazının pH'sının değiştirilmesi ile hazırlanmış formülasyonlara ait *in vitro* klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)). (N11 (pH 6,95), N17 (pH 10), N18 (pH 12)) (n=3)



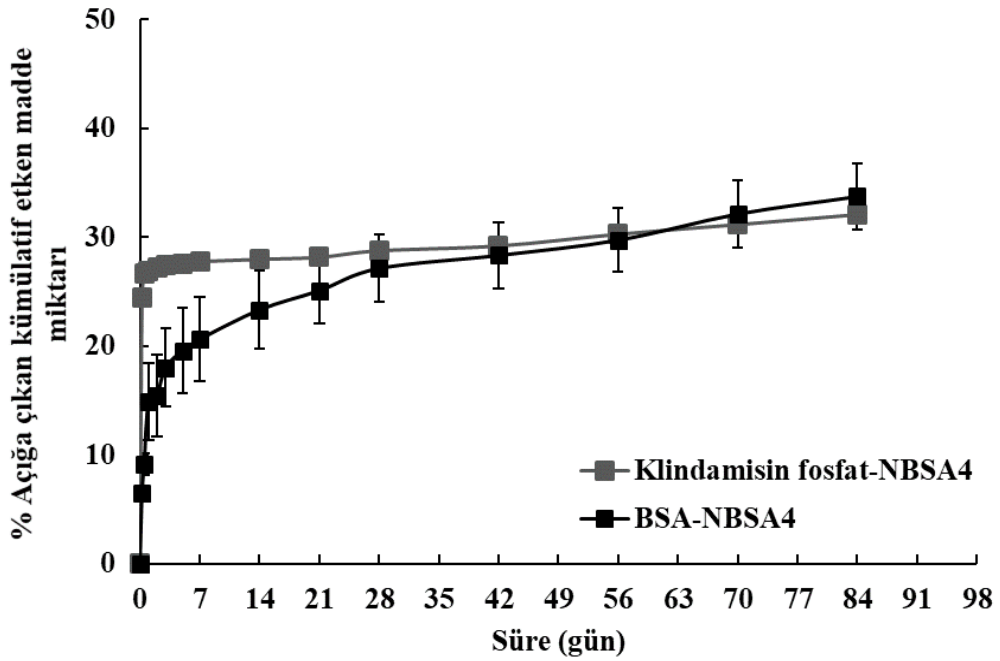
Şekil 3. 40. Kullanılan polimerin değiştirilmesi ile hazırlanmış formülasyonlara ait *in vitro* klindamisin fosfat znme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)). (N11 (24-38 kDa PLGA), N15 (PCL), N29 (7-17 kDa ve 24-38 kDa PLGA)) ($n=3$)



Şekil 3. 41. N17 (sadece klindamisin fosfat içeren (% 0,3 PVA, pH 10)) ve NBSA4 (hem klindamisin fosfat hem de BSA içeren (% 0,3 PVA, pH 10)) formülasyonlara ait *in vitro* klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (2 hafta (a) ve 3 ay (b)) ($n=3$)



Şekil 3. 42. NBSA3 (sadece BSA içeren formülasyon) ve NBSA4 (klindamisin fosfat ve BSA'yı bir arada içeren formülasyon) formülasyonlarına ait in vitro BSA çözünme hızı grafikleri ($n=3$)



Şekil 3. 43. NBSA4 (hem BSA hem klindamisin fosfat içeren nanopartikül) formülasyonundan klindamisin fosfat ve BSA çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)

3.4.4.1. Nanopartiküllerin *In vitro* Salım Kinetiğine Ait Bulgular

In vitro salım çalışmalarından hareketle hesaplanmış olan kinetik parametreleri Çizelge 3.22 ile gösterilmiştir.

Çizelge 3. 22. *In vitro* çözünme hızı deneyleri gerçekleştirilen formülasyonlara ait *in vitro* salım kinetikleri

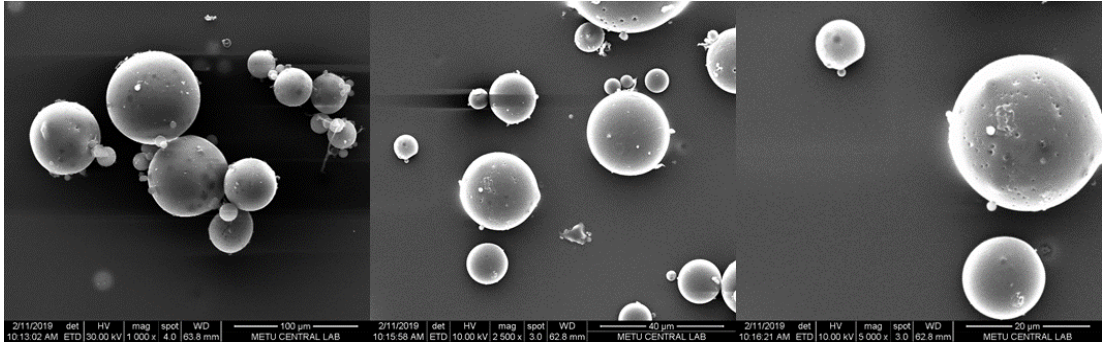
Kinetik modelleri	N11	N12	N15	N17	N18	N20	N25	N29	NBSA4	
0 Derece	k_0	0,018	0,010	0,000	0,004	0,000	0,019	0,000	0,000	0,000
	r^2	0,883	0,888	0,849	0,468	0,736	0,740	0,816	0,408	0,865
	RSS	291,5	89,87	578,8	1247	914	880,9	395,8	464,8	820,2
	SH	0,002	0,001	0,000	0,004	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000
Higuchi	k	0,657	0,372	0,022	0,044	0,019	0,772	0,016	0,024	0,028
	r^2	0,919	0,921	0,849	0,468	0,736	0,936	0,816	0,408	0,865
	RSS	201,3	63,20	578,9	1247	914,8	218,4	395,8	464,9	820,2
	SH	0,056	0,031	0,003	0,004	0,030	0,058	0,002	0,008	0,003
Hixson-Crowell	κ	0,070	0,041	0,113	0,053	0,015	0,141	0,033	0,016	0,073
	r^2	0,911	0,926	0,932	0,978	0,849	0,817	0,902	0,980	0,893
	RSS	0,029	0,007	0,029	0,054	0,038	0,049	0,020	0,188	0,103
	SH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

3.4.5. Nanopartiküllerin Görüntülenmesine Ait Bulgular

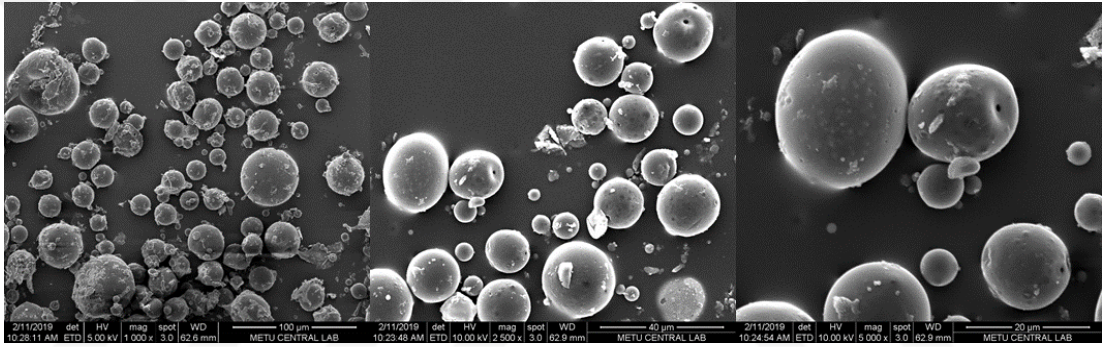
Nanopartiküllerin görüntülenmesi Bölüm 2.2.5.6'da anlatılmış olduğu şekilde SEM ve mikro-BT veya nano-BT ile görüntülenmiştir.

3.4.5.1. Nanopartiküllerin SEM ile Görüntülenmesine Ait Bulgular

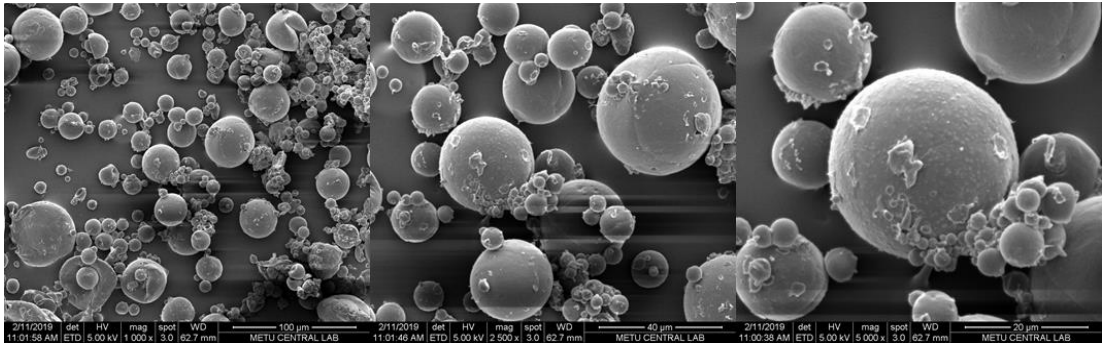
Farklı etken maddeleri içeren nanopartikül formülasyonlarından farklı formülasyon parametrelerinin partikülün yüzey özellikleri, büyüklüğü gibi özelliklerine etkisini anlayabilmek için seçilen bazı formülasyonların SEM analiz sonuçları Şekil 3.44-Şekil 3.50 ile verilmiştir.



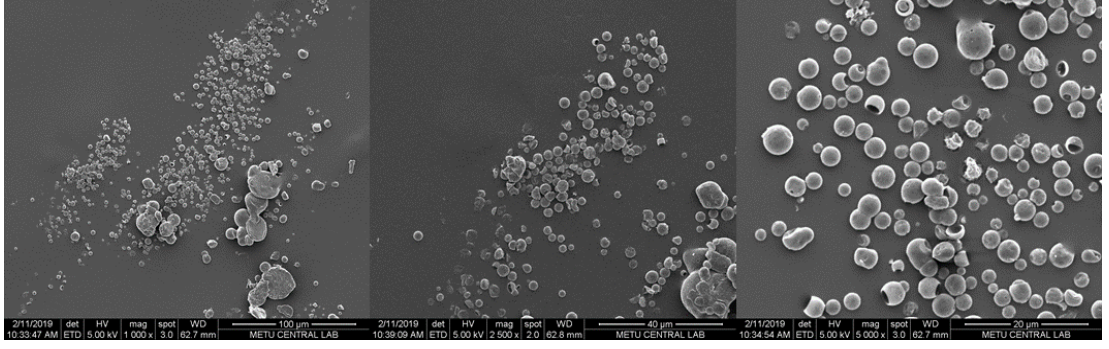
Şekil 3. 44. N11 (iç su fazı 1 mL, dış su fazı % 0,3 PVA ile hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)



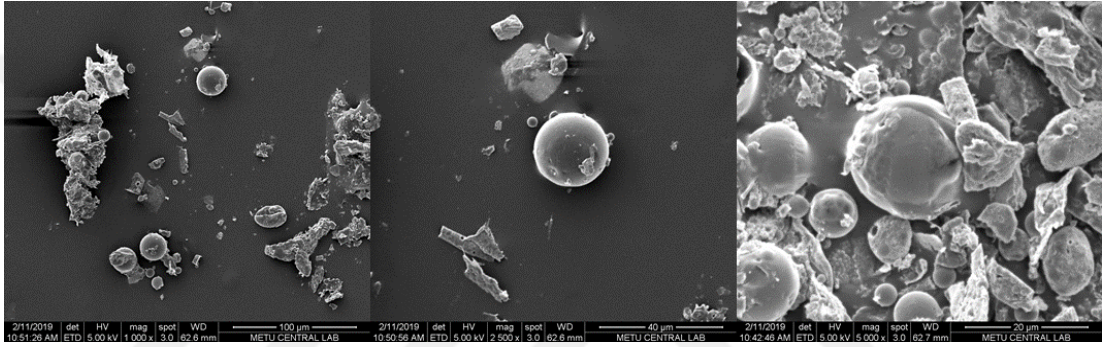
Şekil 3. 45. N12 (iç su fazı 500 µL olacak şekilde hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)



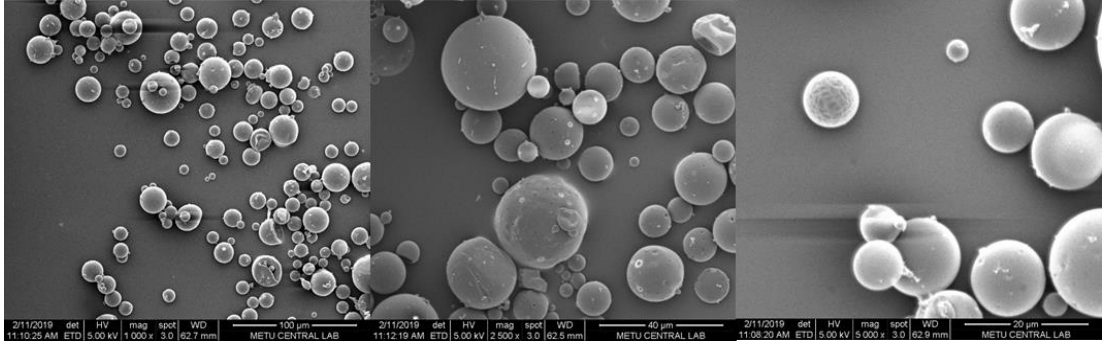
Şekil 3. 46. N15 (PCL ile hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)



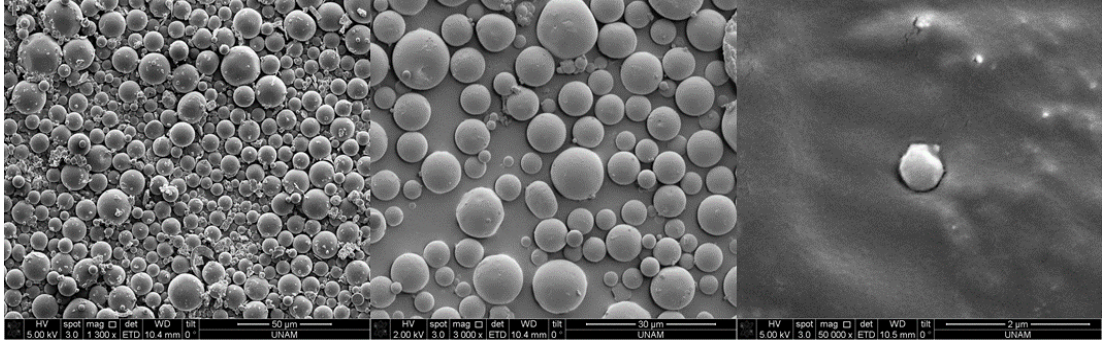
Şekil 3. 47. N18 (dış faz pH'sı 12 olarak ayarlanarak hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)



Şekil 3. 48. N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılarak hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)



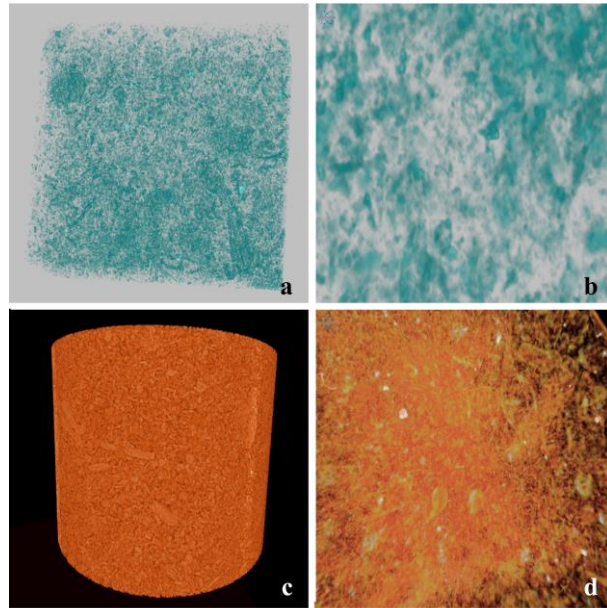
Şekil 3. 49. N25 (klindamisin fosfatın metanolde dağıtılmasıyla hazırlanmış) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1000, x2500, x5000)



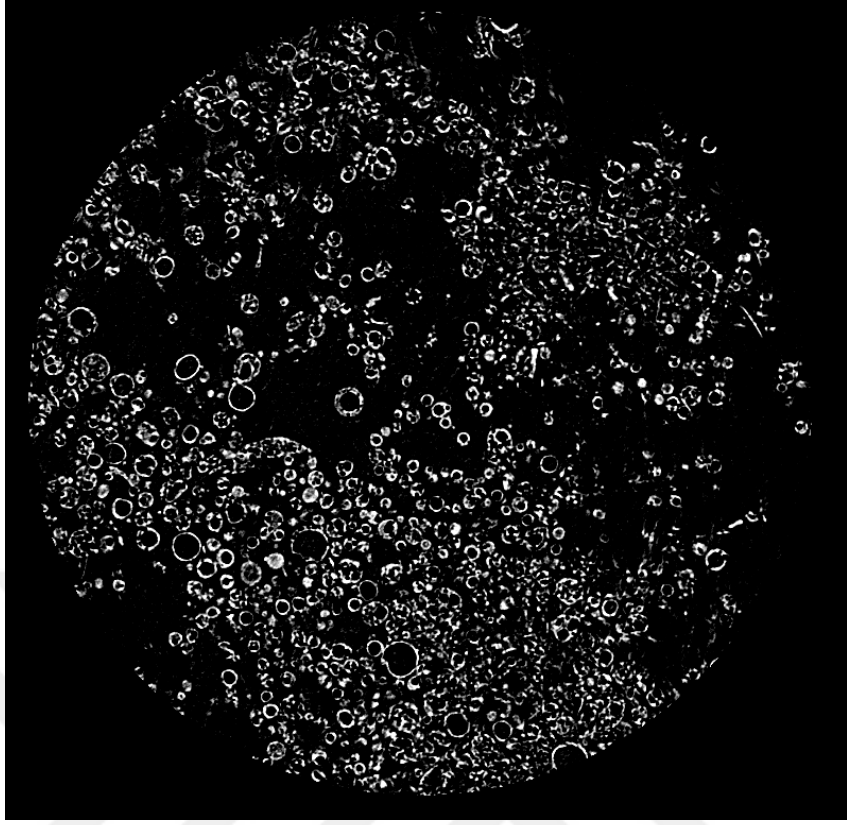
Şekil 3. 50. N34 (klindamisin fosfat ve BMP-7 yi birarada içeren) nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyütme oranları: x1300, x3000, x50000)

3.4.5.2. Nanopartiküllerin Mikro-BT ve Nano-BT ile Görüntülenmesine Ait Bulgular

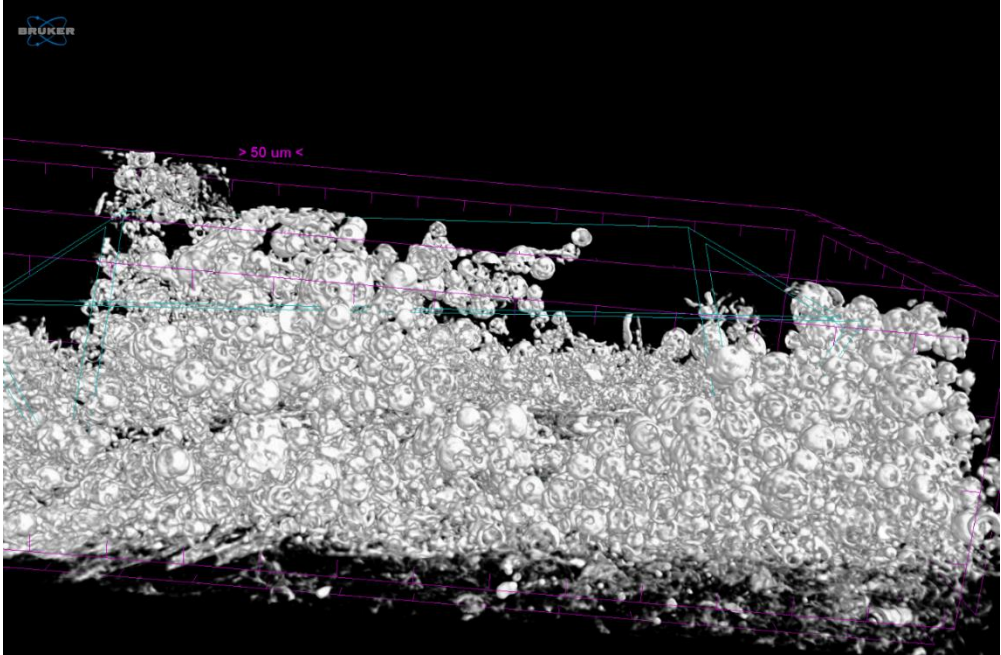
Hazırlanan nanopartiküller üç boyutlu incelenerek, formülasyonlarda değiştirilen bazı parametrelerin nanopartiküllerin yapısal özelliklerine etkisi incelenmiştir. Analizlerin fakültemiz dışında ve yurt dışında yapılması nedeniyle bazı formülasyonlar seçilerek üzerinde çalışılmıştır (Şekil 3.51 – Şekil 3.63 ve Çizelge 3.23).



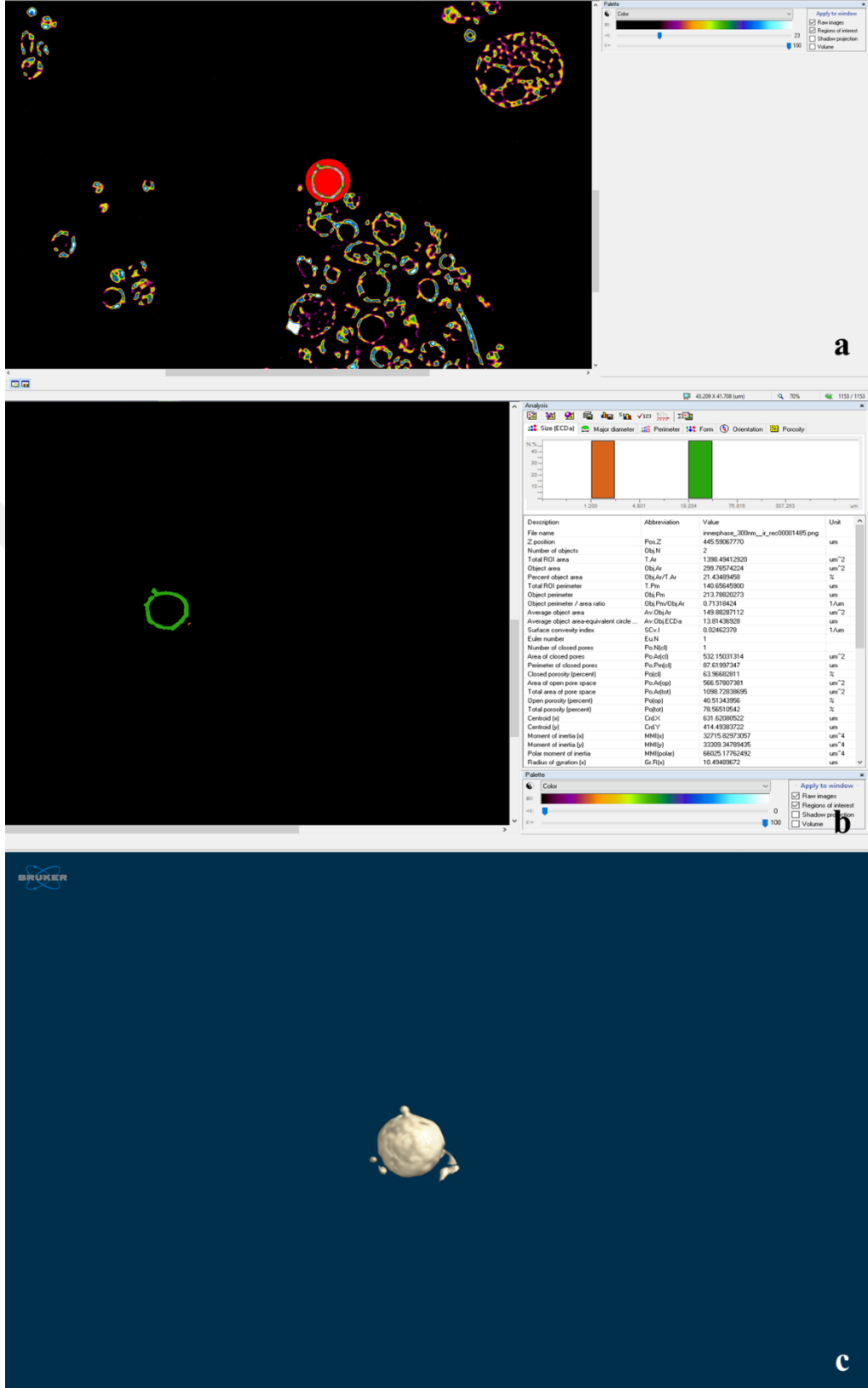
Şekil 3. 51. N3 (dış su fazı % 0,1 PVA) ve N11 (dış su fazı % 0,3 PVA) formülasyonlarına ait Mikro-BT görüntüleri (a ve c genel görüntü, b ve d yakınlaştırmış görüntüler)



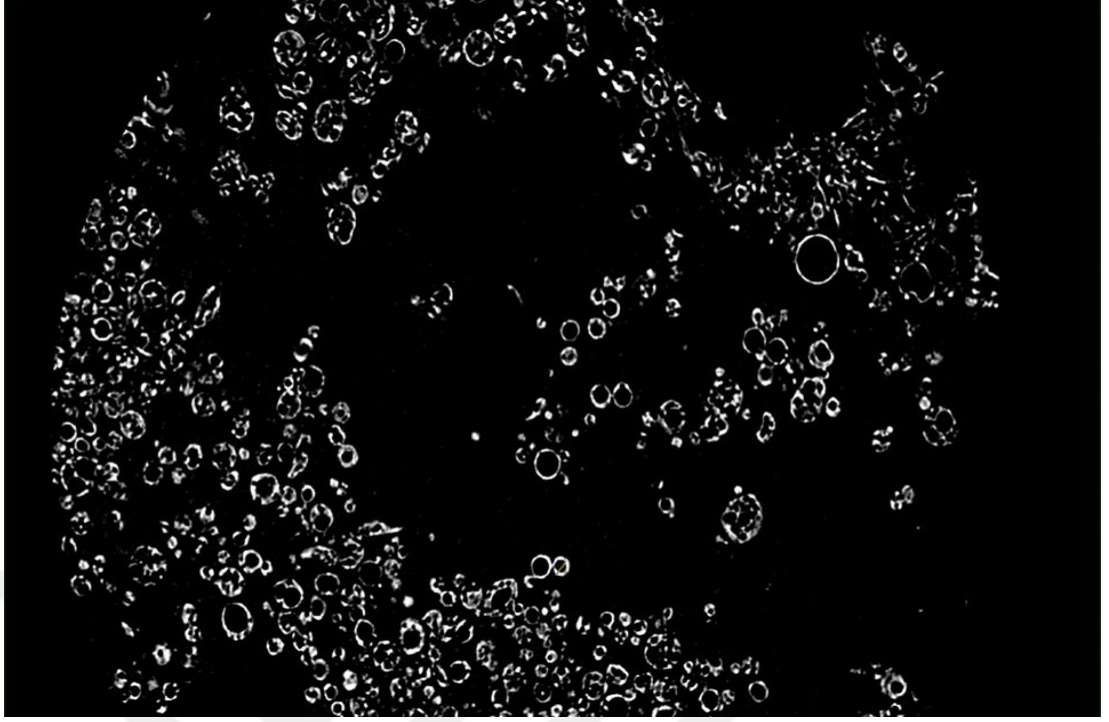
Şekil 3. 52. N12 (iç su fazı 500 μ L olacak şekilde hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 2D aksinel kesiti



Şekil 3. 53. N12 (iç su fazı 500 μ L olacak şekilde hazırlanmış) formülasyonuna ait 3D Nano-BT görüntüsü



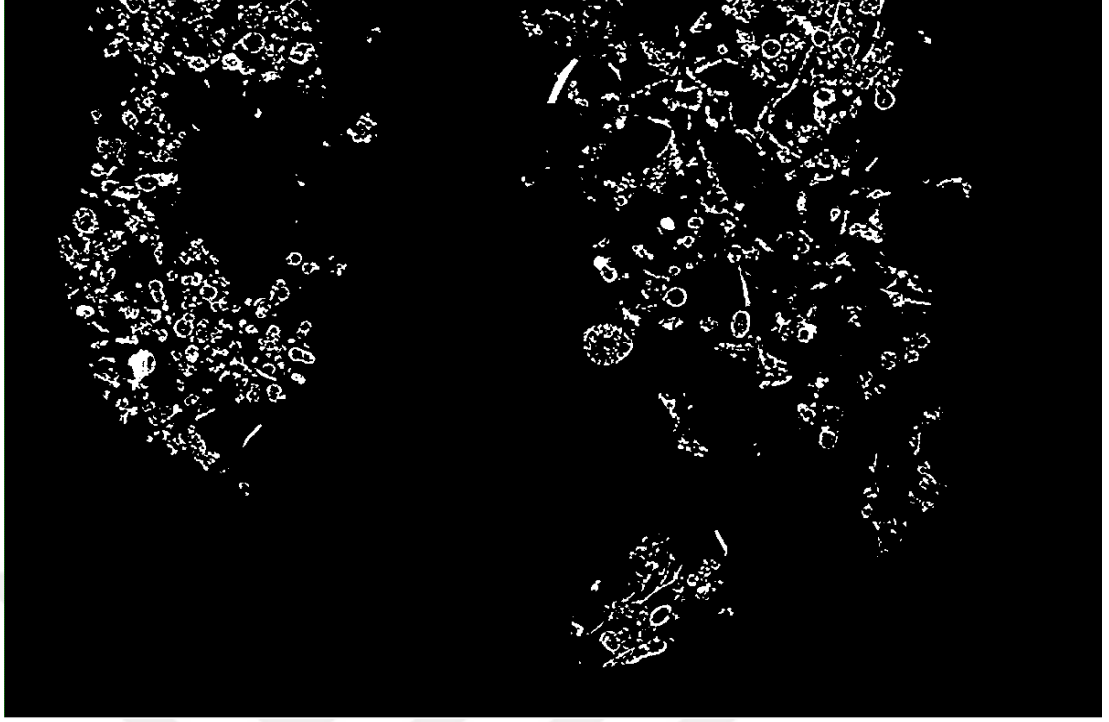
Şekil 3. 54. N12 (iç su fazı 500 μ L olacak şekilde hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT görüntüsü (İlgi alanı belirlenmesi (a) rastgele seçilmiş bir partikülün 2D özelliklerine bakılması (b) ve yine tek partikülün 3D görüntüsü (c))



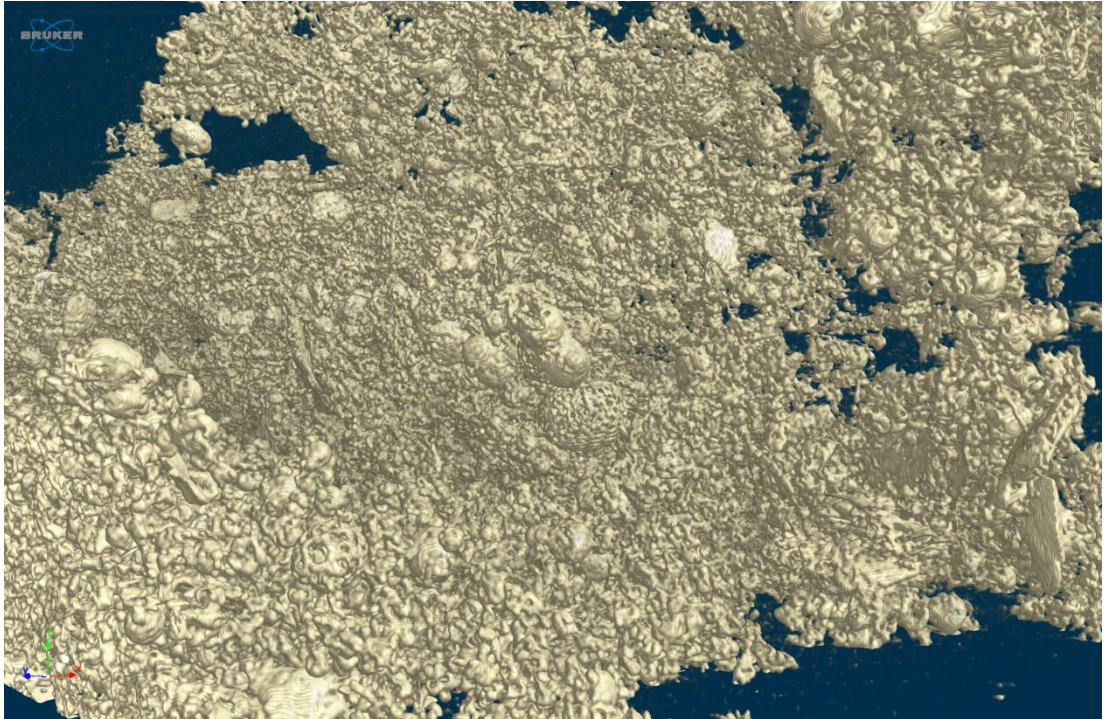
Şekil 3. 55. N15 (PCL ile hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 2D aksenal kesit



Şekil 3. 56. N15 (PCL ile hazırlanmış) formülasyonuna ait 3D Nano-BT görüntüsü



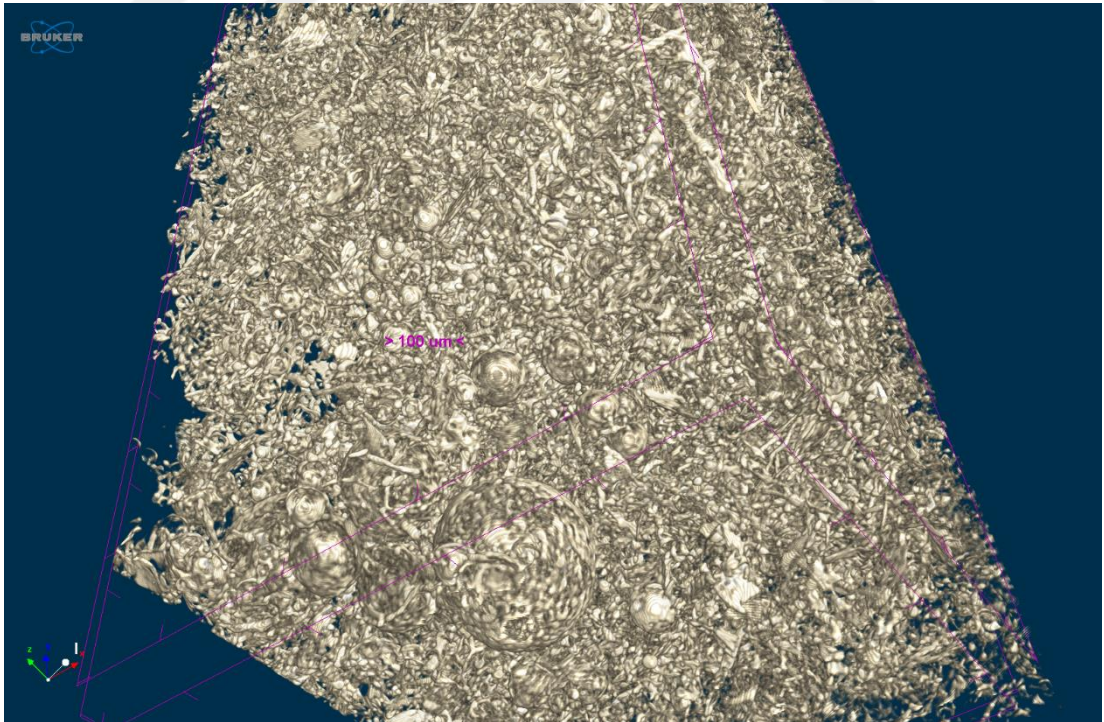
Şekil 3. 57. N18 (dış faz pH'sı 12 olarak ayarlanarak hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 2D eksenel görüntü



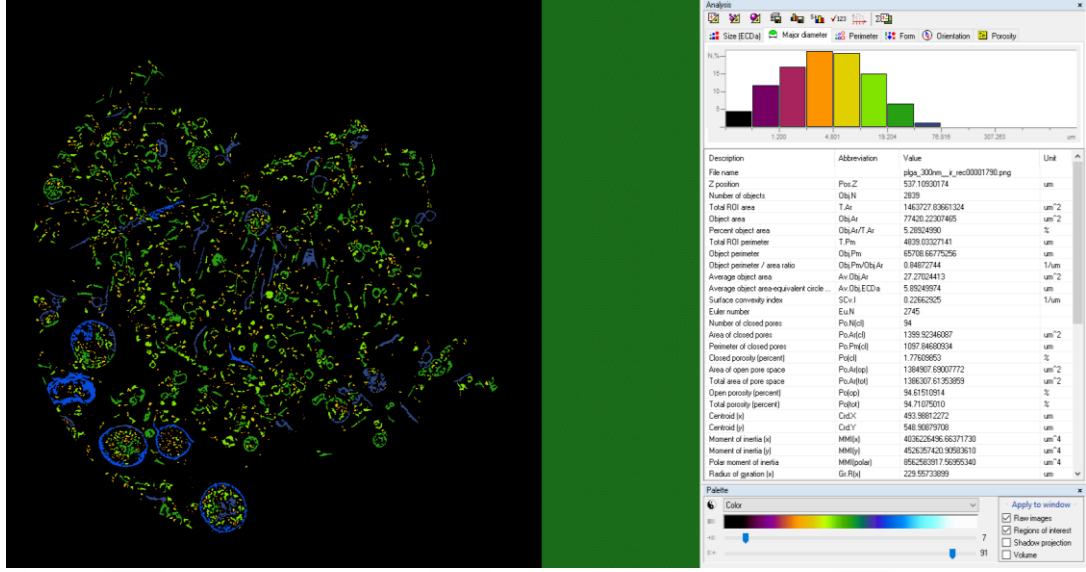
Şekil 3. 58. N18 (dış faz pH'sı 12 olarak ayarlanarak hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 3D görüntüsü



Şekil 3. 59. N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılarak hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 2D eksenel kesit görüntüsü



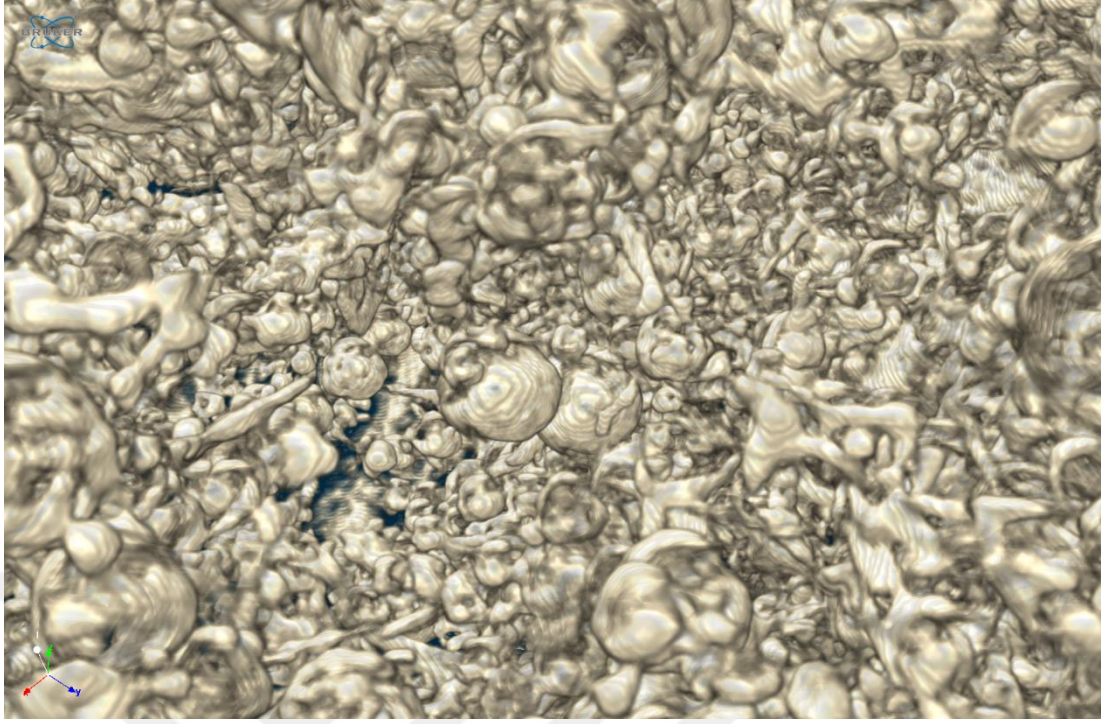
Şekil 3. 60. N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılarak hazırlanmış) formülasyonuna ait Nano-BT 3D görüntüsü



Şekil 3. 61. N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılarak hazırlanmış) formülasyonuna ait nano-BT 2D aksinel görüntüsünün boyuta göre renklendirilmesi



Şekil 3. 62. N25 (klindamisin fosfatın metanolde dağıtılmasıyla hazırlanmış) formülasyonuna ait nano-BT 2D aksinel görüntüsü



Şekil 3. 63. N25 (klindamisin fosfatın metanolde dağıtılmasıyla hazırlanmış) formülasyonuna ait nano-BT 3D görüntüsü

Çizelge 3. 23. Nanopartiküller için seçilmiş nano-BT analiz parametreleri

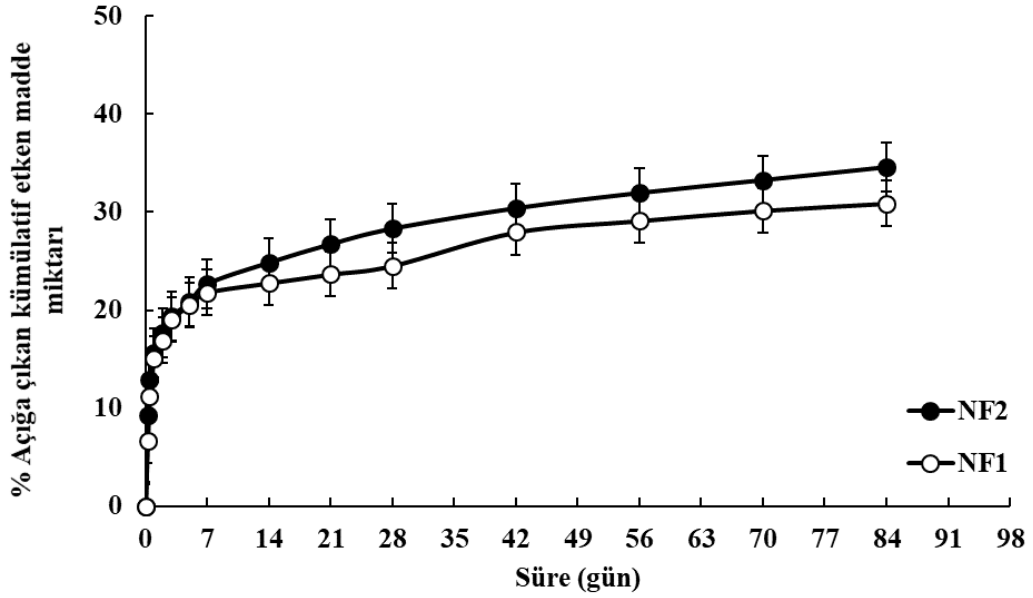
Formülasyon	SMI	Porozite (%)	Ortalama Partikül çapı (nm)
N11	3,1	13,9	-
N12	3,6	60,1	237,4
N15	2,9	84,0	156,7
N18	3,8	87,3	162,3
N20	3,1	80,6	118,4
N25	3,6	76,3	196,2

3.5. Nanopartikül-Film ve Nanopartikül-Greft Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulgular

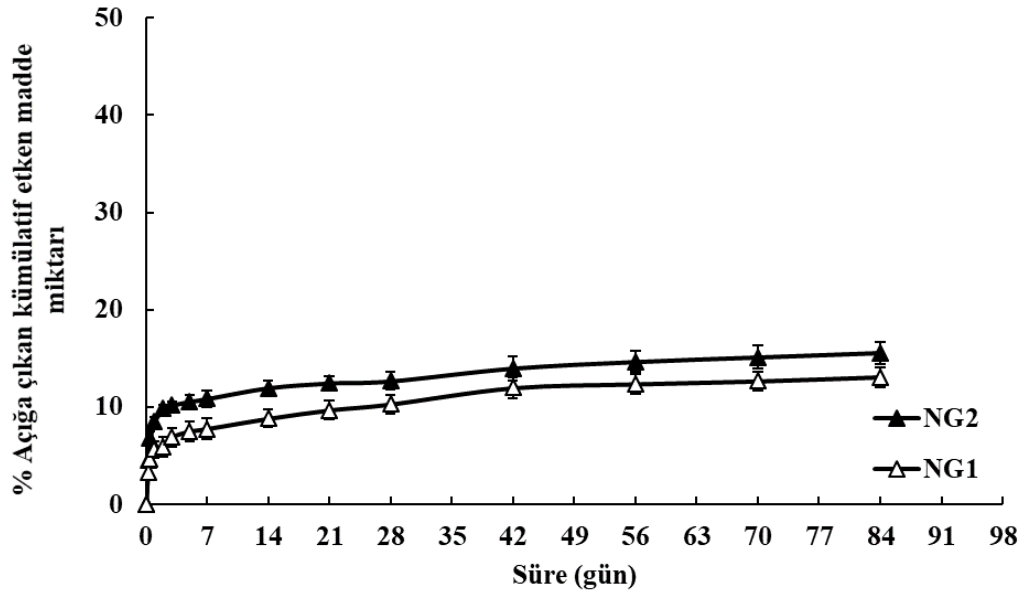
Kombinasyon formülasyonlarının özellikleri Bölüm 2.2.6’da anlatılmış olduğu şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Kombinasyon Formülasyonlarının *In vitro* Çözünme Hızı Deneylerine Ait Bulgular

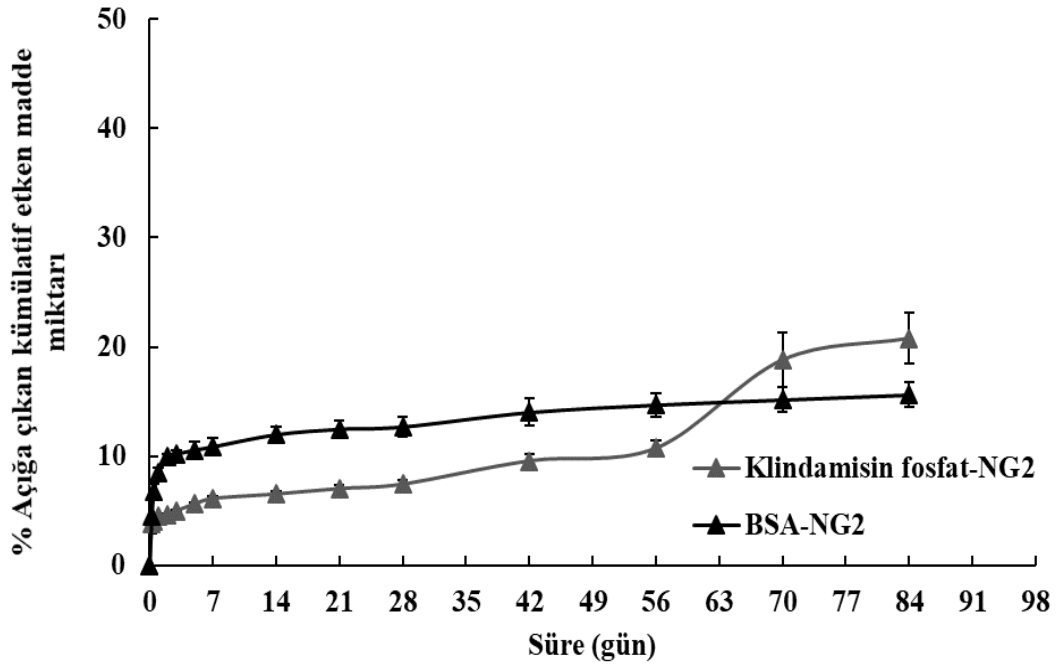
Bölüm 2.2.6.1’de anlatılmış olduğu şekilde gerçekleştirilen kombinasyon formülasyonlarının *in vitro* çözünme hızı deneylerine ait salım profilleri Şekil 3.64-Şekil 3.68 ile gösterilmiştir. Salım profilindeki etken madde BSA’dır.



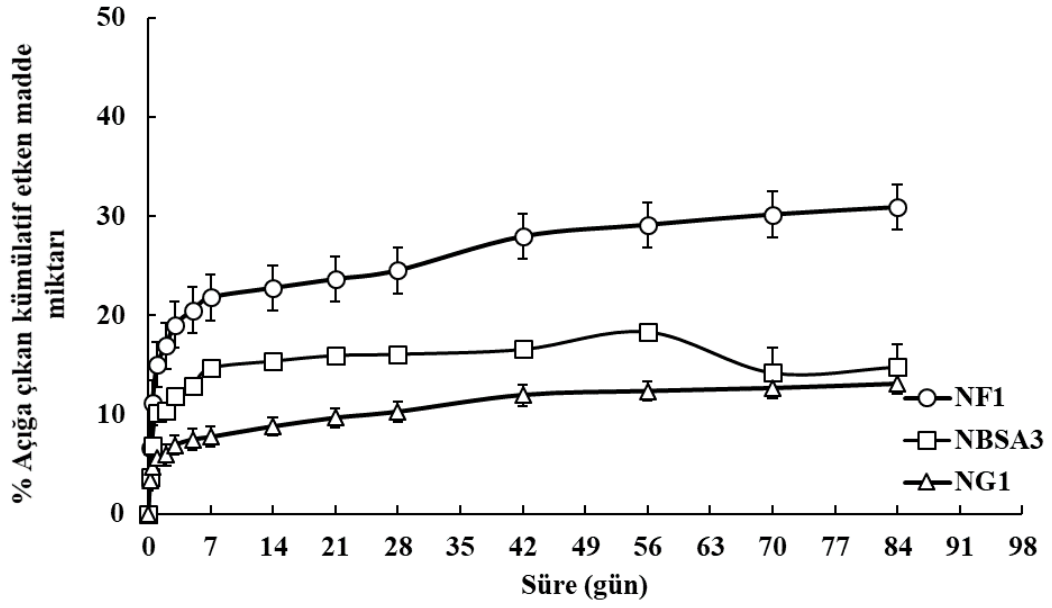
Şekil 3. 64. Nanopartikül-film kombinasyon formülasyonlarına ait *in vitro* çözünme hızı grafikleri (NF1: Film+BSA yüklü nanopartikül; NF2: Film+BSA ve klindamisin fosfat yüklü nanopartikül) (n=3)



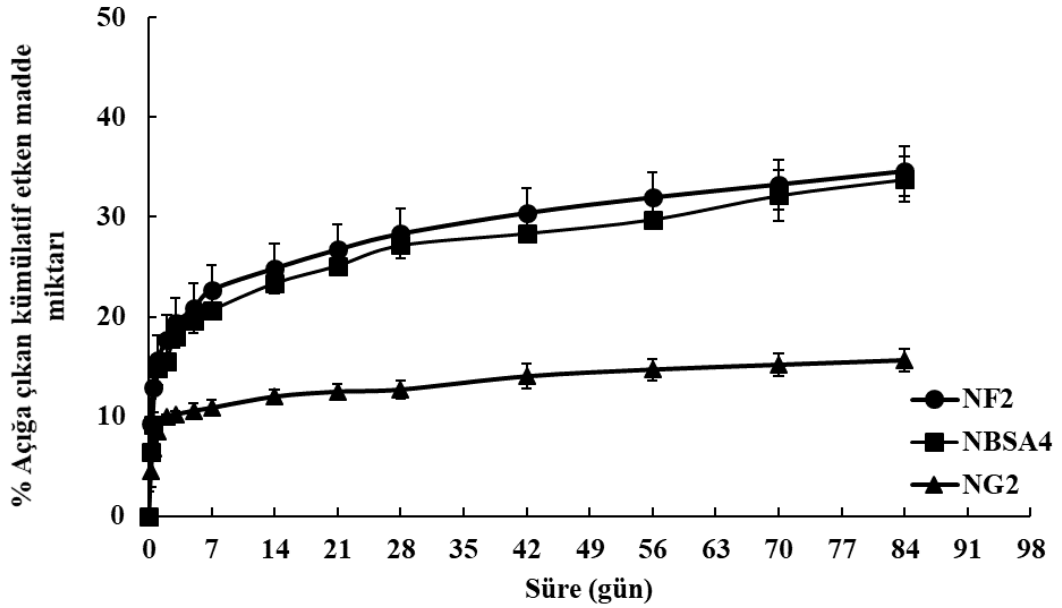
Şekil 3. 65. Nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonlarına ait *in vitro* çözünme hızı grafikleri (NG1, Greft+BSA yüklü nanopartikül; NG2, Greft+BSA ve klindamisin fosfat yüklü nanopartikül) ($n=3$)



Şekil 3. 66. NG2 ((hem BSA hem klindamisin fosfat içeren nanopartikül yüklü greft) formülasyonundan klindamisin fosfat ve BSA çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$))



Şekil 3. 67. Kombinasyon formülasyonları (BSA yüklü NF1 ve NG1) ve kombinasyon formülasyonlarında kullanılmış olan nanopartiküle (NBSA3) ait çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)



Şekil 3. 68. Kombinasyon formülasyonları (BSA ve klindamisin fosfat yüklü NF2 ve NG2) ve kombinasyon formülasyonlarında kullanılmış olan nanopartiküle (NBSA4) ait çözünme hızlarının karşılaştırılması ($n=3$)

3.5.1.2. Kombinasyon Formülasyonlarının *In vitro* Salım Kinetiklerine Ait Bulgular

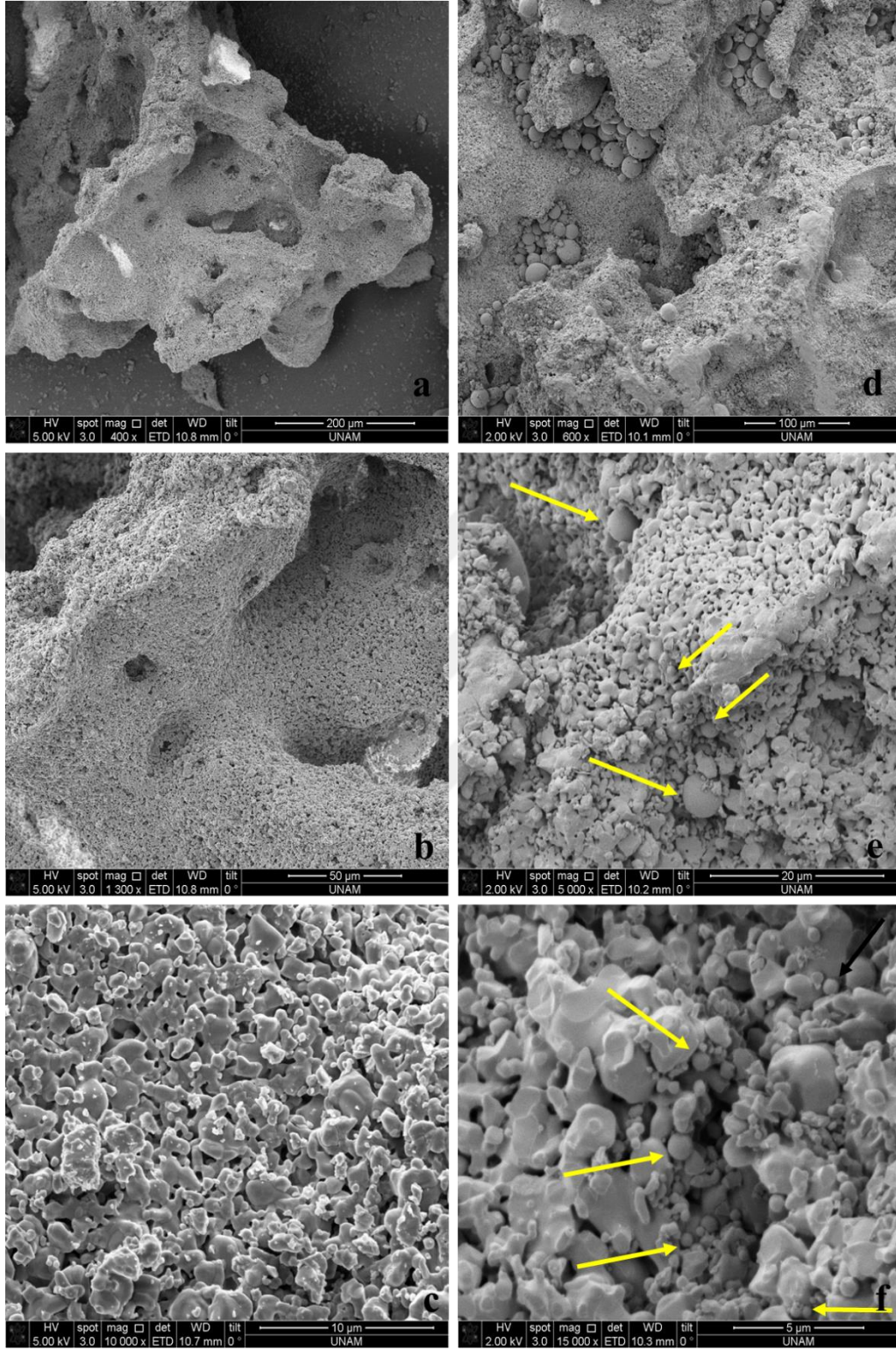
In vitro çözünme hızı çalışmalarından hareketle hesaplanmış olan kinetik parametreleri Çizelge 3.24 ile gösterilmiştir.

Çizelge 3. 24. *In vitro* çözünme hızı deneyleri gerçekleştirilen formülasyonlardan model etken madde olarak kullanılan BSA'nın *in vitro* salım kinetikleri

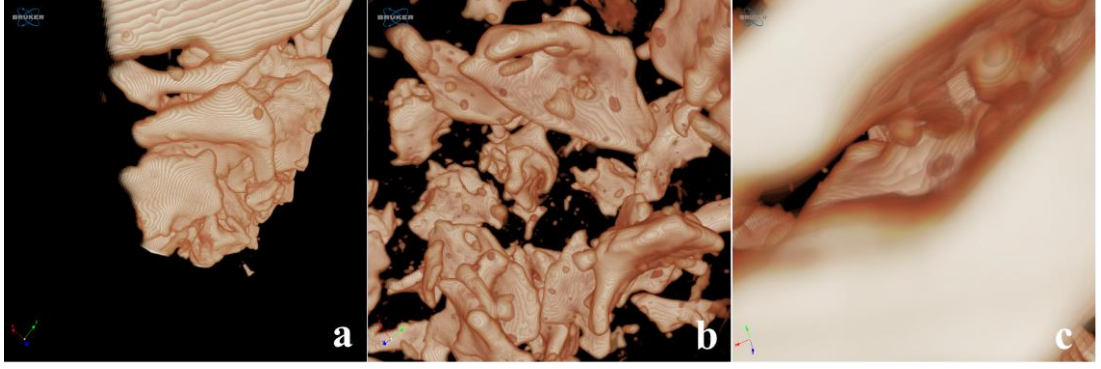
Kinetik modelleri		NBSA3	NBSA4	NF1	NF2	NG1	NG2
0 Derece	k_0	0,013	0,023	0,022	0,024	0,009	0,011
	r^2	0,502	0,631	0,585	0,605	0,636	0,555
	RSS	1048	2086	2249	2560	315	663
	SH	0,004	0,005	0,005	0,006	0,002	0,030
Higuchi	k_H	0,561	0,970	0,931	1,027	0,380	0,480
	r^2	0,892	0,886	0,850	0,866	0,886	0,823
	RSS	430,1	646,5	813,4	869,9	98,63	263,2
	SH	0,082	0,101	0,113	0,117	0,039	0,064
Korsmeyer-Peppas	k	0,354	0,424	0,471	0,512	0,286	0,371
	n	0,321	0,379	0,359	0,358	0,243	0,285
	r^2	0,889	0,825	0,774	0,759	0,895	0,779
	RSS	0,310	0,344	0,425	0,460	0,109	0,262
SH	0,050	0,053	0,058	0,061	0,030	0,046	
Hixson-Crowell	κ	0,155	0,225	0,237	0,256	0,086	0,127
	r^2	0,572	0,807	0,756	0,796	0,818	0,714
	RSS	0,063	0,120	0,119	0,126	0,014	0,028
	SH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

3.5.2. Kombinasyon Formülasyonlarının SEM ve Mikro-BT ile Görüntülenmelerine Ait Bulgular

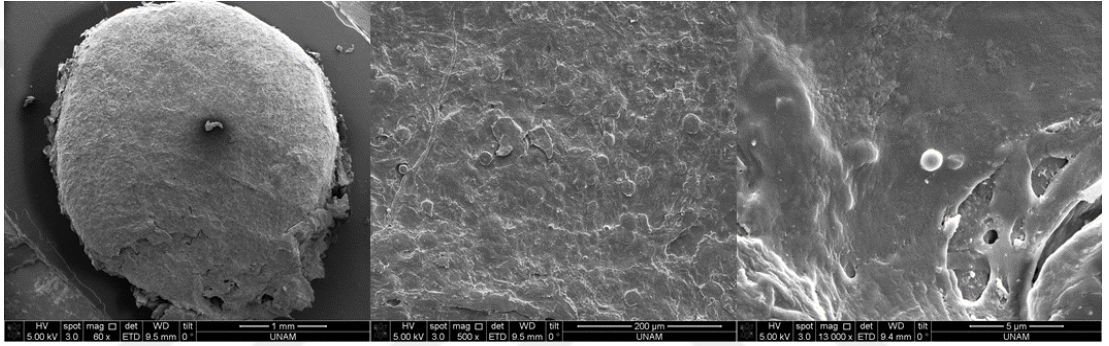
Nanopartikül-greft (NG2) formülasyonuna ve boş grefte ait SEM görüntüsü Şekil 3.69 ile ve mikro-BT görüntüsü Şekil 3.70 ile gösterilmiştir. Nanoartikül-film kombinasyon formülasyonunun SEM görüntüsü ise Şekil 3.71 ile gösterilmiştir.



Şekil 3. 69. Tek başına sentetik greft materyali (a-c) ve NG2 (klindamisin fosfat ve BMP-7 içeren nanopartikül ile greft kombinasyonu) formülasyonuna (d-f) ait SEM görüntüleri



Şekil 3. 70. Tek başına greft (a), nanopartikül-greft kombinasyonu (b) ve nanopartikül-greft kombinasyonunun yakınlaştırılmış (c) mikro-BT görüntüsü



Şekil 3. 71. NF2 (klindamisin fosfat ve BMP7 içeren nanopartikülün filmle kombinasyonu) formülasyonuna ait SEM görüntüleri (Soldan sağa büyüme oranları: x60, x500, x13000)

3.6. Formülasyonların *In vivo* Etkinliğine Ait Bulgular

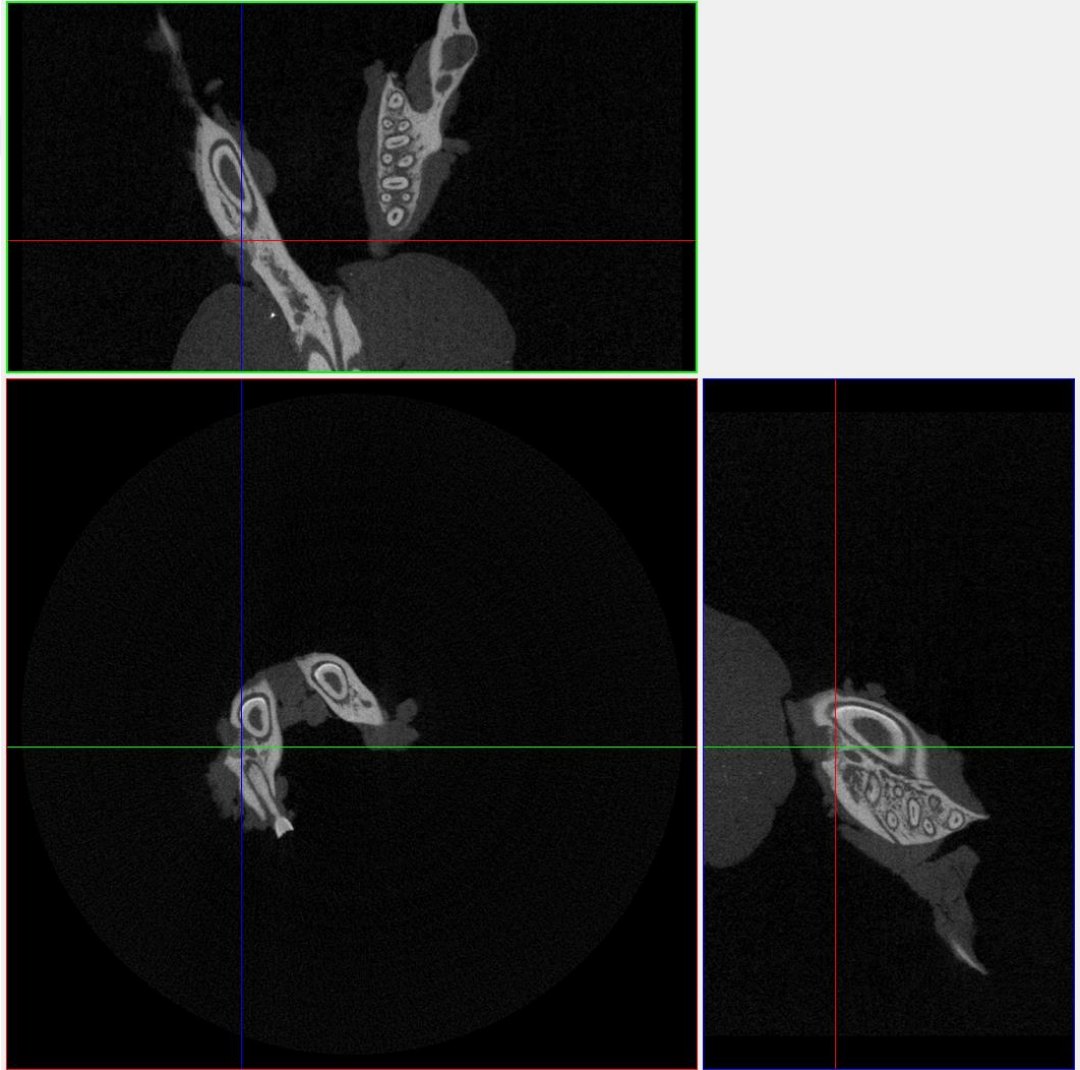
In vivo deneyler sonucu elde edilmiş dokular mikro-BT ile görüntülenerek analizleri yapıldıktan sonra histopatoloji deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Dokuların Mikro-BT Analizine Ait Bulgular

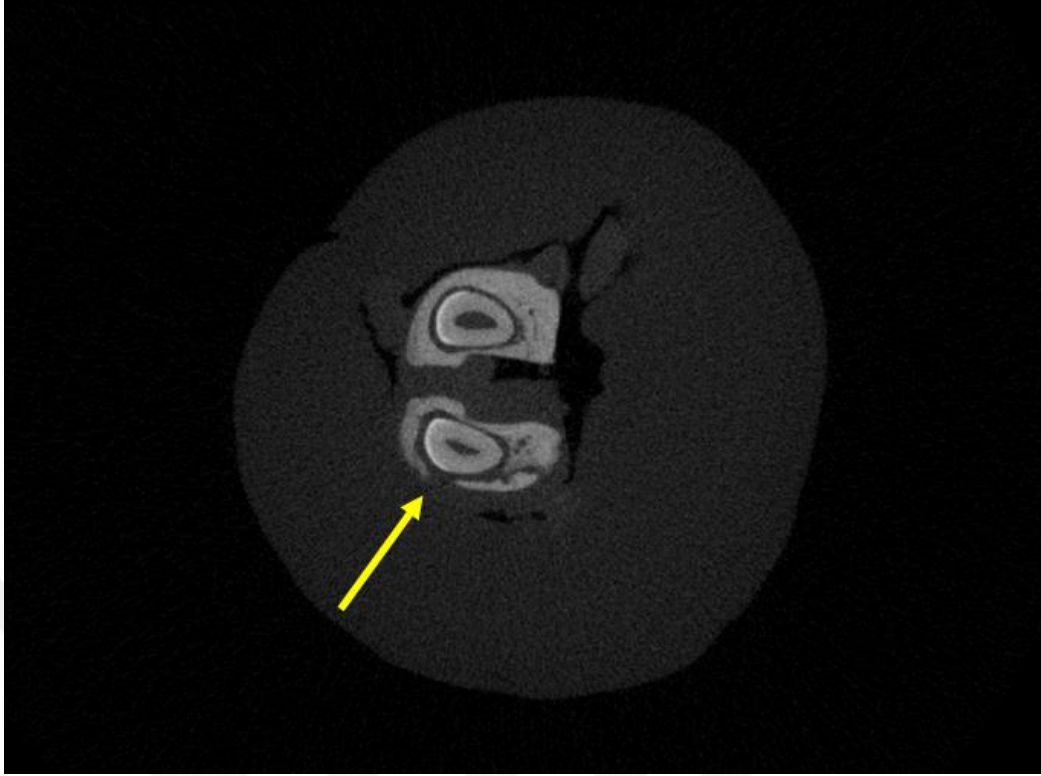
Bölüm 2.2.8.3'te anlatılmış olduğu şekilde gerçekleştirilmiş mikro-BT analiz sonuçları, analiz aşaması (Şekil 3.72 – Şekil 3.76), yeni oluşan kemik dokusu hacmi (Çizelge 3.25) ve 3D görüntüler (Şekil 3.77) ile gösterilmiştir.

Çizelge 3. 25. Mikro-BT analizleri sonucu yeni oluşan kemik dokusu hacimleri

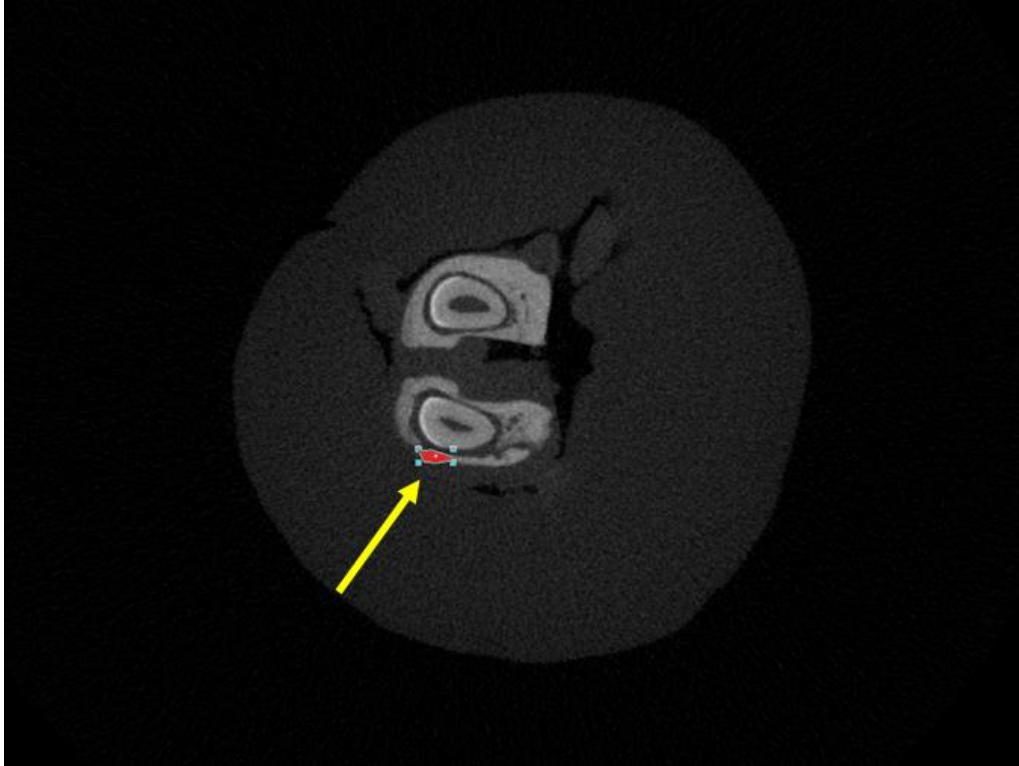
Formülasyon	VOI - 2. hafta (mm ³)	VOI - 4. hafta (mm ³)
Kontrol (-)	0,005	0,162
N33	0,201	0,305
N34	0,497	0,829
NF1	0,216	0,841
NF2	0,417	0,837
NG1	0,195	0,488
NG2	0,056	0,578



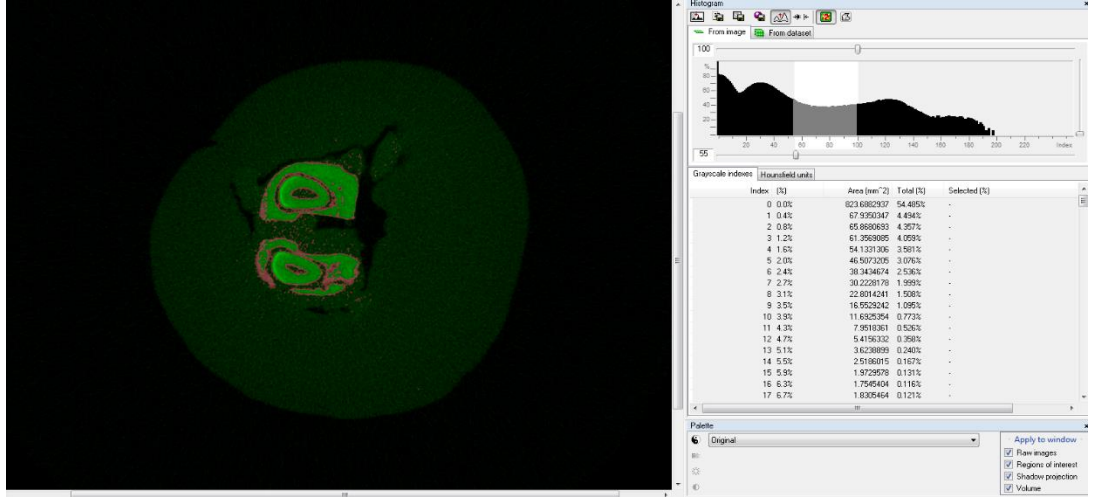
Şekil 3. 72. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-1: Mandibulanın aksenel dilimi ve defektin tüm eksenlerden gözlenmesi



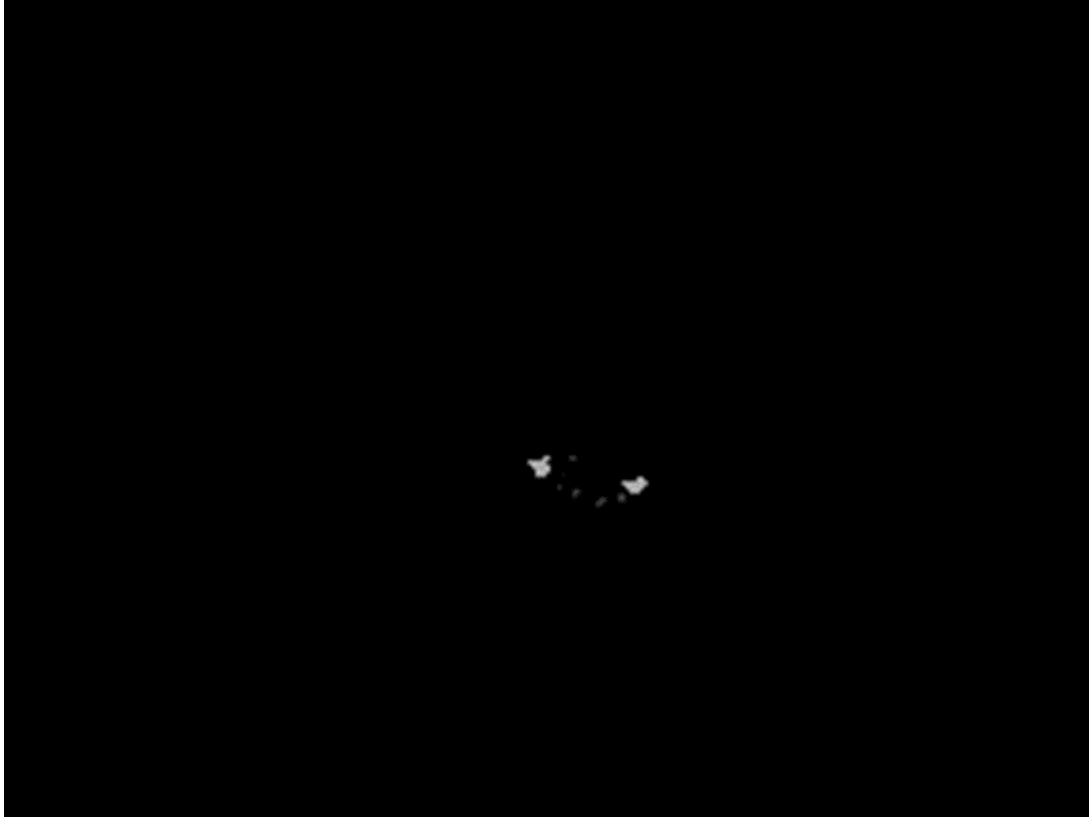
Şekil 3. 73. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-2: Mandibulanın aksel dilimi ve defektin gözlenmesi



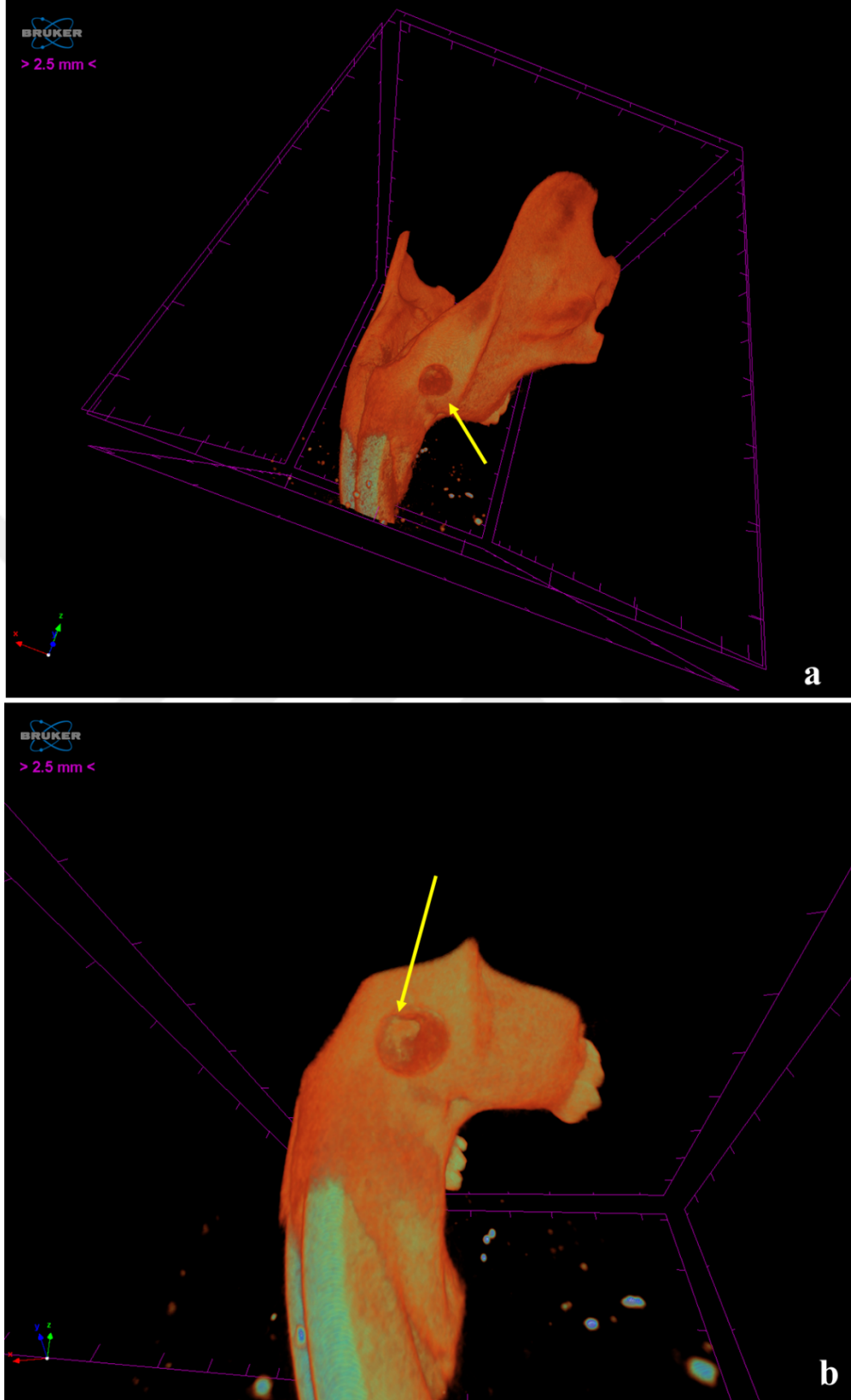
Şekil 3. 74. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-3: Sadece defektli bölgeyi içeren ROI seçimi



Şekil 3. 75. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-4: Görüntünün gri seviye histogramı ve eşiklenmesi



Şekil 3. 76. Mandibular kemik dokusunun mikro-BT ile görüntülenmesi-5: Oluşan yeni kemik dokusunun tüm mandibuladan ayrılarak görüntülenmesi ve hacminin hesaplanması



Şekil 3. 77. Mandibulanın mikro-BT ile hazırlanmış 3D görüntüsü (a) ve kemik iyileşmesinin 3D görüntü üzerinde gözlenmesi (b) (Görüntü, defektli bölgeye klindamisin fosfat ve BMP-7'yi birarada içeren N34 nanopartikül formülasyonu uygulanmış rat mandibulasına aittir.)

3.6.2. Dokuların Patomorfolojik Analizlerine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.8.4.3'te anlatılmış olan şekilde gerçekleştirilmiş histopatolojik analizlerin skorlama sonuçları Çizelge 3.26 ve Çizelge 3.27 ile gösterilmiştir.

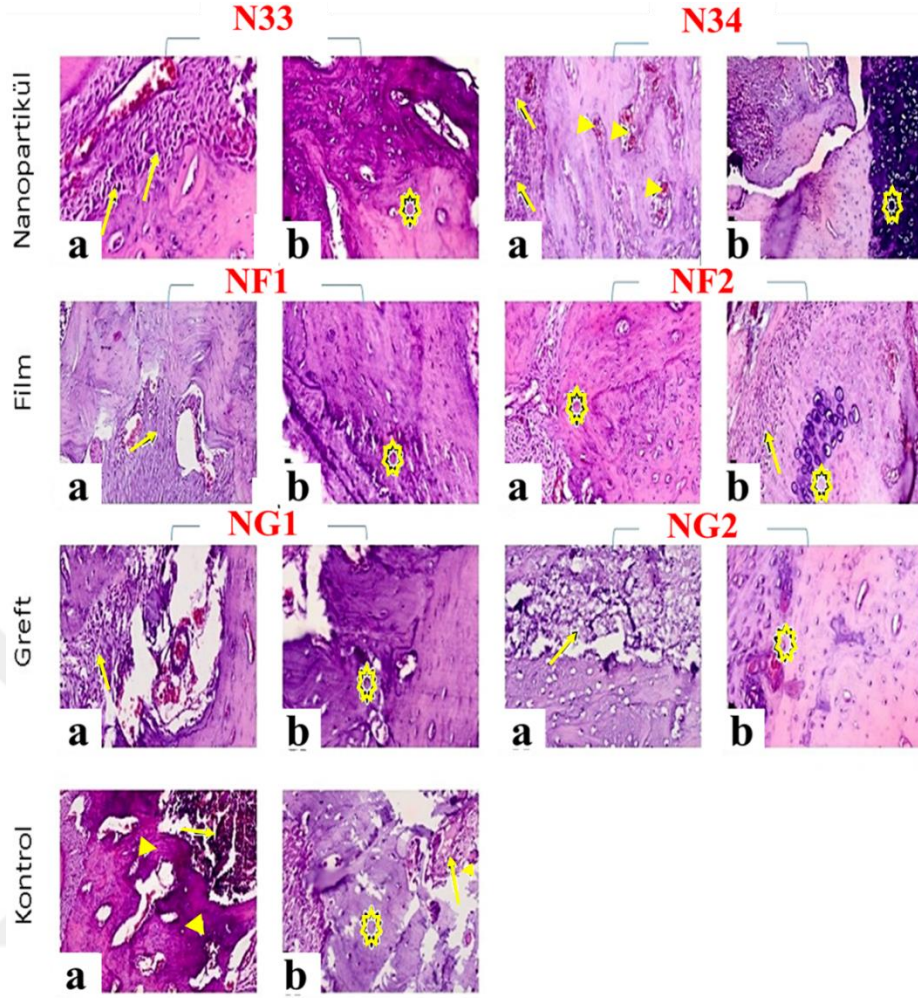
Çizelge 3. 26. Gruplara göre deneklerdeki makroskopik bulguların ortalama skorlaması

Gruplar	Yangısal değişiklikler	Kanama	Kemikleşme	Dejeneratif-nekrotik değişiklikler	Anormal kemik yapısı
Kontrol	+	-	+	++	-
N33	-	-	++	-	-
N34	-	-	++	-	-
NF1	-	-	+	+	-
NF2	-	-	+	+	-
NG1	-	-	+	+	-
NG2	-	-	+	+	-

Çizelge 3. 27. Gruplara göre deneklerdeki histopatolojik bulguların ortalama skorlaması

Gruplar	Osteoblastik proliferasyon	Osseöz niş	Kondrosit proliferasyon	Fibrosit proliferasyon	Kapillarizasyon	Yangı	Dejeneratif-nekrotik değişiklikler
Kontrol	+	-	-	+	+	+	++
N33	++	++	++	-	+++	-	-
N34	+++	++	++	-	+++	-	-
NF1	++	+	+	-	++	-	+
NF2	+++	++	+	-	++	-	+
NG1	++	+	-	-	++	-	+
NG2	++	+	-	-	++	-	+

Deney gruplarına göre elde edilmiş olan görsel histopatolojik bulgular Şekil 3.74 ile gösterilmiştir.



Şekil 3. 78. Deney gruplarına göre histopatolojik bulgular

N33; (a) Osteoblastik proliferasyon ve kapillarizasyon (oklar), x200, H&E, (b) kondromatöz yapıdan gelişen osseöz yapı (yıldız), x200, H&E.

N34; (a) Osseöz niş içerisinde yaygın osteoblastik proliferasyon (oklar), kapillarizasyon (ok başları), kondromatöz alan (yıldız), x100, H&E, (b) kondromatöz yapıdan gelişen osseöz yapı (yıldız), x200, H&E.

NF1; (a) Hafif derecede osteoblastik proliferasyon ve fibroblastik aktivite (ok), x100, H&E, (b) kondromatöz yapıdan gelişen osseöz yapı (yıldız), x200, H&E.

NF2; (a) Orta derecede osteoblastik proliferasyon ve kemik yapı (yıldız), x100, H&E, (b) osteoblastik proliferasyon ve fokal kondromatöz alan (yıldız), x100, H&E.

NG1; (a) Hafif derecede osteoblastik proliferasyon (ok) ve defekt alanı ile düşük vaskülarizasyon alanı, fokal osseöz niş (ok başı) x100, H&E (b) defektli alan çevresinde gelişen zayıf osseöz yapı (yıldız), x200, H&E

NG2; (a): Hafif derecede osteoblastik proliferasyon (ok) ve çevresinde geniş defektle dolu dejenere-nekrotik alan, x100, H&E. (b) defektli alan çevresinde gelişen fokal kondromatöz ve osseöz yapılar (yıldız), x200, H&E.

Kontrol; (a) Kanama ve yangı hücrelerini içeren defektli alan (ok), çevresinde kemikte hafif vaskülarizasyon alanıyla birlikte dejenere osseöz yapı (ok başları), x100, H&E. (b) Dejenere kemik yapı (yıldız), defektli alanın çevresinde fibroblastik aktivite ve iç tarafında çok hafif derecede osteoblastik proliferasyon (ok) ve defektli bölgeyi temizleyen osteoklastik hücre (ok başı), x200, H&E.

4. TARTIŞMA

4.1. Etken Maddeler Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Klindamisin fosfat ve BMP-7 üzerinde gerçekleştirilmiş olan deneylere ait bulgular ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

4.1.1. Klindamisin Fosfat Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Klindamisin fosfatın Bölüm 2.2.1.1’de anlatıldığı üzere gerçekleştirilmiş olan DSC taraması sonucunda 199,27 °C’de saf haldeki klindamisin fosfata ait endotermik bir pik elde edilmiştir (Şekil 3.1). Elde edilen bu değerin referans olarak kullanılmış literatürlerdeki değerlerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Tamaddon ve ark., 2015; Vranic ve ark., 2007). Termogramda görünmekte olan 94,36 °C’deki endotermik pik ise maddenin içerisinde hapsolmuş suya ait piktir.

Klindamisin fosfatın çözünme ortamı içinde (pH 6,75 fosfat tamponu) 200-400 nm dalga boyu aralığında spektrumu alındığında maksimum absorbans verdiği dalga boyu literatürlerle uyumlu olarak 210 nm bulunmuştur (Şekil 3.2) (EP9.0; Ibrahim ve ark., 2017).

Klindamisin fosfatın miktar tayini üzerinde yapılmış olan detaylı literatür ve farmakope taramasından sonra HPLC yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir (EP9.0; Ghaffari ve ark., 2015; Ibrahim ve ark., 2017; Kilicarslan ve ark., 2014b). Klindamisin fosfat için Çizelge 2.1 ile gösterilmiş olan çalışma koşulları kullanılarak pH 6,75 fosfat tamponu ve % 0,3 PVA ortamlarındaki kalibrasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş (Şekil 3.3 - Şekil 3.6) ve her iki ortam için de determinasyon katsayısı (r^2) 0,9999 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1). Bire yakın olan r^2 değerleri HPLC

kromatogramlarından hesaplanan alan değerlerine karşılık gelen derişim değerlerinin güvenilir olduğunu göstermiştir.

Klindamisin fosfatın HPLC ile miktar tayinine yönelik analitik validasyon çalışmaları Bölüm 2.2.3'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapılan doğruluk ve geri elde çalışmalarında hesaplanan %BSS değerlerinin %2'den küçük olması kullanılan miktar tayini yönteminin doğruluğunu göstermiştir (Çizelge 3.2). Ayrıca yapılmış olan kesinlik çalışmaları sonucunda Bölüm 2.2.3.2 'de anlatıldığı şekilde tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik değerlendirilmiş olup %BSS değerlerinin %2'den küçük olması kullanılan yöntemin kesinliğini ve tekrarlanabilirliğini göstermiştir (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4). Yöntemin seçiciliğinin analizi için formülasyonda kullanılan maddelerin tek başına ve etken madde ile hazırlanan karışımları HPLC ile analiz edilmiş, girişim olmadığı tespit edilmiştir. Bölüm 2.2.3.4'te anlatıldığı şekilde hesaplanmış olan teşhis ve tayin alt sınırına ait bulgulara göre hem pH 6,75 fosfat tamponu hem de % 0,3 PVA çözeltisi ile elde edilmiş LOD ve LOQ değerleri kalibrasyon doğrusunu oluşturan alt sınırın (2 µg/mL) altında yer almaktadır (Çizelge 3.5). Bu da çok küçük derişimlere kadar ölçüm yapılabileceğini göstermektedir. Doğrusallık için hazırlanan derişimlere karşılık gelen alan değerleri kullanılarak elde edilen kalibrasyon doğrusu incelendiğinde çalışılan tüm derişimler %95 güven aralığı içinde olduğu saptanmıştır (Şekil 3.7). Validasyon çalışmasının sonuçları karar verilen analiz yöntemi ile çalışma aralığında kullanılacak etken madde miktarının doğru ve tekrarlanabilir ve hızlı bir şekilde analiz edilebileceğini kanıtlamıştır.

4.1.2. BMP Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

BMP-7'nin kalibrasyonu için hazırlanmış logaritmik grafik, analiz sertifikasında verilmiş olan grafikte uyumaktadır (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). Ayrıca derişime karşı absorbans değerlerinin geçirilmesi ile oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ait r^2 değerinin bire yakın olması ($r^2=0,9991$), çalışılan yöntemin güvenilirliğini kanıtlamıştır (Şekil 3.10).

ELISA kit sertifikasında yer alan ve Çizelge 3.6 ile gösterilmiş olan validasyon parametreleri ise bu yöntemin BMP-7 analizi için güvenilir, seçici, tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.

Ayrıca BMP yerine kullanılan BSA için de yapılmış olan kalibrasyon ile elde edilmiş olan kalibrasyon doğrusunun r^2 değerinin bire yakın olması ($r^2=0,9981$) yöntemin güvenilir olduğunu göstermiştir (Şekil 3.11).

4.2. Film Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Hazırlanmış olan kitozan, aljinat ve aljinat-kitozan kompleks filmlerin özelliklerinin incelenmesine ait bulgular ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

4.2.1. Kitozan Filmlerin Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda farklı molekül ağırlıklarında (yüksek (HC), orta (MC) ve düşük (LC)) kitozan kullanılmış ve asit ortamda çözünürlüğü olan bu polimer, referanslardan yola çıkılarak asetik asit ile çözülmüş ve polimer çözeltileri hazırlanmıştır (Banerjee ve Ganguly, 2019; Bettini ve ark., 2008; Kalaycioglu ve ark., 2017; Patra ve ark., 2016; Sah ve ark., 2019). Kullanılacak asetik asitin derişimine karar vermek için farklı yüzdelerde (% 1, % 1,5 ve % 2 h/h) asetik asit çözeltileri hazırlanmış ve 0,2 g MC veya HC bu çözeltilerde çözülmüş ve Çizelge 2.2 ile gösterilmiş olan (C1- C6) film formülasyonları hazırlanmıştır.

Viskozite açısından değerlendirildiğinde aynı molekül ağırlığındaki kitozan ile hazırlanmış filmlerde asetik asit derişiminin değişmesiyle viskozitede bir değişim olmazken, yüksek molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan filmlerde (C4-C6) orta

molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan filmlere göre (C1-C3) viskozitenin yaklaşık iki kat artmış olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.7).

Filmlerin elastikiyet ve sertlikleri incelendiğinde ise kırılğan yapısından dolayı formülasyona bir plastizerin ilave edilmesi gerekmiş ve bu amaçla sıklıkla tercih edilen propilen glikol (Ahmed ve ark., 2019; Xu ve ark., 2019) daha önceki film çalışmalarımızdaki deneyimlerimiz de göz önünde bulundurularak (Kilicarşlan ve Gorgoz, 2012; Kilicarşlan ve ark., 2014a) % 5 (h/h) olacak şekilde klindamisin fosfatın da eklenmiş olduğu film formülasyonlarına ilave edilmiştir (Çizelge 2.3). Sonuçta bu derişim ve miktarda PG kullanımıyla elastikiyet açısından uygun filmler elde edilebildiği tespit edilmiştir. C1-C6 formüllerinden yola çıkılarak etken madde ve plastizer içeren formülasyonlar yine MC ve HC ile ve farklı derişimlerdeki asetik asit ile hazırlanmış (C7-C12) (Çizelge 2.3.) ve bu formülasyonlarda hangi derişimdeki asetik asit ile kitozan çözeltisi hazırlandığında etken madde salımında gözlenebilecek farklılıkların ayırt edici olabileceği incelenmiştir. Bunun üzerine Şekil 3.14 ve Şekil 3.15 ile gösterilmiş olan *in vitro* çözünme hızı profillerine bakıldığında % 1 (C7 ve C10) ve % 2 (h/h) (C9 ve C12) derişimde asetik asit ile hazırlanmış formülasyonlarda kullanılan kitozanın molekül ağırlığının çözünme hızı profiline etkisinin gözlenemediği ($p > 0,05$), fakat % 1,5 (a/h) derişimde asetik asit ile hazırlanmış formülasyonlarda (C8 ve C11) kullanılan polimer farkının etkisinin izlenebildiği görülmüştür ($p < 0,05$). Bu etki göz önünde bulundurulduğunda formülasyonlara % 1,5 (a/h) derişimdeki asetik asit ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 3.7 ile gösterilmiş olduğu gibi formülasyonlara plastizerin ve etken maddenin ilave edilmesi viskozite üzerinde anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir (C1'de $0,40 \pm 0,01$ Pa.s iken C7'de $0,38 \pm 0,03$ Pa.s; C2'de $0,41 \pm 0,00$ Pa.s iken C8'de $0,42 \pm 0,03$ Pa.s; C3'te $0,52 \pm 0,00$ Pa.s iken C9'da $0,55 \pm 0,00$ Pa.s) ($p > 0,05$). Ayrıca filmlerin kalınlıkları ve alınan kesitlerin ağırlıklarında da (Çizelge 3.7) hem polimer tipi değişimi hem de çözücü derişimi değişimi ile anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$). İşlem etkinliğinin ise % 67,4 ile % 99,5 arasında değiştği, MC ile elde edilen filmlerde işlem etkinliği

verilerinin HC ile elde edilenlere göre biraz daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Şişme derecelerinde ise polimer tipi ve asetik asit derişimi değişimi anlamlı bir fark yaratmamıştır (Çizelge 3.10).

Kitozan film formülasyonlarının hazırlanacağı asetik asit derişimine karar verildikten sonra (%1,5 h/h) polimer derişimi değiştirilerek (% 1, % 2 ve % 3 (a/h)) yeni formülasyonlar hazırlanmıştır. HC ile yüksek derişimde istenilen özelliklerde, kolay dökülebilir ve homojen kurutulabilir filmler elde edilemediği için çalışmaya orta molekül ağırlıklı (C8, C13 ve C14) (Çizelge 2.4) ve düşük molekül ağırlıklı kitozan (C15-C17) (Çizelge 2.5) ile devam edilmiştir.

Çizelge 3.7 ile gösterilmiş olduğu gibi polimer derişiminin % 1'den % 2'ye çıkmasıyla hem orta molekül ağırlıklı kitozan ((C8) $0,42 \pm 0,03$; (C13) $5,47 \pm 0,06$ Pa.s), hem de düşük molekül ağırlıklı kitozan ((C15) $0,02 \pm 0,00$; (C16) $0,38 \pm 0,12$ Pa.s) ile hazırlanmış olan filmlerde viskozite 10 kattan fazla artmıştır. Bu artışla birlikte kalınlık verileri ile kalınlık değerlerinin standart sapma değerleri de artmıştır (Çizelge 3.7). Ayrıca derişim artışı ile birlikte film formülasyonlarından alınan 3,5 mm çapındaki film kesitlerinin ağırlığı da artmıştır. Bununla birlikte polimer derişiminin % 1'den % 3'e artırılması ile % işlem etkinliği orta molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan film formülasyonlarında $98,8 \pm 3,67$ 'den $58,6 \pm 11,4$ 'e, düşük molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan filmlerde ise $97,2 \pm 12,5$ 'ten $76,5 \pm 2,22$ 'ye düşmüştür. Bu sonuç da etken madde miktarı sabit tutulurken formülasyondaki polimer derişiminin artışında beklenen bir durumdur.

Kitozan filmlerin şişme özellikleri Bölüm 2.2.4.8'de anlatılmış olduğu şekilde incelenmiş elde edilen veriler Eşitlik 2.5'te yerine koyularak Çizelge 3.10 ile gösterilmiş olan veriler elde edilmiştir. Filmler *in vitro* çözünme hızı deneyiyle aynı zaman aralıklarında tampon ortamından alınarak tartılmıştır. Tüm film formülasyonlarının *in vitro* çözünme hızı sonuçları göz önüne alındığında ilk iki saatte formülasyondaki etken maddenin yaklaşık % 50'sinden daha fazlasının çözünerek ortama salındığı gözleendiği için % şişme dereceleri ilk iki saat verileri olarak verilmiştir (Çizelge 3.10). Bu verilere göre % 1 yüksek (C11), % 1 orta (C8) ve % 1

düşük molekül ağırlıklı kitozan (C15) ile hazırlanmış olan filmlerin şişme dereceleri kıyaslandığında C15 formülasyonundaki % şişme derecesinin ($266,4 \pm 59,24$) anlamlı derecede yüksek olduğu sonucuna varılmıştır ($p < 0,05$).

In vitro çözünme hızı verileri karşılaştırıldığında düşük molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanmış olan filmlerde derişimin artması çözünme hızı profilinde belirgin bir fark yaratmazken (Şekil 3.16), orta molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanmış formülasyonlarda ilk bir saatteki etken madde salım hızı, derişim artışı ile yavaşlatılabilmiş olsa da, % 1 derişimde kitozan kullanılmış olan formülasyonla (C8) sekiz saat boyunca kontrollü salım sağlanabilmiştir (Şekil 3.17). Farklı molekül ağırlığındaki % 1 derişimdeki filmler kıyaslandığında ise en yavaş etken madde salımının orta molekül ağırlıklı kitozan ile (C8) sağlanabildiği gözlenmiştir (Şekil 3.17).

Farklı molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanmış olan filmler kıyaslandığında hedeflenen şişme, yükleme etkinliği ve salım profiline en yakın değerler orta ve düşük molekül ağırlıklı kitozan ile elde edilebilmiştir. Fakat ana hedef olan 12 saate kadar salım tek başına kitozan kullanılarak elde edilememiştir.

4.2.2. Aljinat Filmlerin Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmada düşük ve orta viskoziteli sodyum aljinat kullanılarak film formülasyonları hazırlanmıştır. Bunun için öncelikle % 1 (a/h) sodyum aljinat içeren (A1) film formülasyonu hazırlanmış, yapısı ve esnekliği incelenmiştir. Kitozan filmlerde olduğu gibi elde edilen bu film kırılğan olduğu için formülasyona plastizer (% 5 (h/h) propilen glikol) ilave edilmiştir. Düşük viskoziteli ve orta viskoziteli sodyum aljinatın farklı derişimleri ile (% 1, % 2, % 3 ve % 4 (a/h)) oluşturulmuş çözeltileri ile hazırlanmış film formülasyonları Çizelge 2.6 (A1 - A5) ve Çizelge 2.7 (A6 - A9) ile gösterilmiştir.

Çizelge 3.8’de verilmiş olan viskozite verilerine göre aljinat derişiminin artması ile viskozite de artmış ($0,18 \pm 0,03$ Pa.s (A2) $-5,82 \pm 0,03$ Pa.s (A9)) ve bu değişim en fazla orta viskoziteye sahip aljinat ile hazırlanmış olan filmlerde gözlenmiştir (A6 - A9). Yine Çizelge 3.8’e göre her iki aljinat türü için de filmlerin kalınlık ve ağırlıklarının her iki molekül ağırlığındaki aljinat için de polimer derişimindeki artışa paralel olarak arttığı tespit edilmiş, en büyük artış derişim % 1’den % 4’e çıktığında gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Sodyum aljinat ile hazırlanmış olan filmlerde de kitozan ile hazırlanan filmlerdeki gibi işlem etkinliği derişim artışı ile birlikte azalmıştır (% 1 derişimde düşük viskoziteli aljinatla hazırlanmış film (A2) için % işlem etkinliği $99,3 \pm 7,54$ iken, % 4 derişimde hazırlanmış film (A5) için $88,7 \pm 2,97$; % 4 derişimde orta viskoziteli aljinatla hazırlanmış film (A6) için % işlem etkinliği $93,6 \pm 7,16$ iken, % 4 derişimde hazırlanmış film (A5) için $86,5 \pm 3,22$ ’dir.) (Çizelge 3.11).

Sodyum aljinatın suda çok iyi çözünmesi sebebi ile tampon ortamına konulan aljinat filmlerin yapısı ilk yarım saat içerisinde bozulmuş, bu sebeple şişme derecesi hesaplanamamıştır (Çizelge 3.11).

Şekil 3.19 ile gösterilmiş olduğu gibi farklı derişimlerde düşük viskoziteli aljinat ile hazırlanmış olan filmlerde *in vitro* etken madde çözünme hızında anlamlı farklılık gözlenmemiş ve salım altı saate kadar sürdürülebilmştir. Orta viskoziteli aljinat ile hazırlanmış olan filmlere bakıldığında ise derişim artışı ile salım hızının yavaşlatılabildiği ve en yavaş salımın % 4 (a/h) derişimdeki aljinat çözeltisi ile hazırlanmış formülasyonla (A9) elde edildiği gözlenmiştir. % 1 polimer içeren formülde etken maddenin %100’ünün 3 saate açığa çıktığı, ancak polimer miktarının %4’e çıkması ile (A9) 8 saate ancak % 78,48’e kadar etken maddenin açığa çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 3.20).

4.2.3. Aljinat-Kitozan Kompleks Filmlerin Hazırlanması ve Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Önformülasyon çalışmalarımızın ilk aşamasında katyonik bir polimer olan kitozan ve anyonik bir polimer olan aljinat ayrı ayrı film haline getirilmiş, fakat formülasyonların uygulanmasının düşünüldüğü diş oluğunu ya da maksillofasiyal implant ameliyatlarındaki uygulamanın yapılacağı ortamı *in vitro* taklit eden ortamda filmlerin fiziksel dayanıklılıklarını uzun süre koruyamaması, etken madde salımının en fazla sekiz saate kadar uzatılabilmesi gibi sebeplerle oluşturulan ilaç salım sisteminin hem daha dayanıklı hale getirilmesi hem de salımın uzatılabilmesi için polielektrolit kompleks (PEC) oluşturulması düşünülmüştür.

Kitozan ve aljinatla PEC oluşturulması için kullanılan yöntem iyonotropik jelasyondur (Algul ve ark., 2015; Kilicarslan ve ark., 2018; Komoto ve ark., 2019; Wu ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda PEC filmler sodyum aljinatın karboksil (-COOH) ve kitozanın amin (-NH₂) gruplarının elektrostatik etkileşime girmesi sağlanarak elde edilmiştir. Aljinatla kompleks oluşturan Ca⁺² kaynağı olan CaCl₂ kompleksasyon işleminde sıklıkla çapraz bağlayıcı olarak kullanılmaktadır (Banerjee ve Ganguly, 2019; Madhumathi ve ark., 2018; Mirtic ve ark., 2018; Prakash ve ark., 2019). Bu sebeple çalışmamızda oluşacak kompleks yapının dayanıklılığını arttırmak için formülasyona CaCl₂ eklenmesi uygun bulunmuştur. Prakash ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada periodontal kemik defektlerinin tedavisinde kullanılmak üzere oluşturdukları amoksisilin yüklü PVA-aljinat filmleri % 10 CaCl₂ içine daldırarak çapraz bağlamışlardır (Prakash ve ark., 2019). Alsharabasy ve ark. (2016) hazırlamış oldukları komplekse de % 2 CaCl₂ ilave etmiş ve bu işlemin aljinatın stabilizasyonunu da sağladığını belirtmişlerdir (Alsharabasy ve ark., 2016). Fakat çalışmamızda etken maddenin oluşturulacak kompleks yapının içerisine yüklenmesi ve kompleks yapının koaservatlar halinde film içinde dağılması amaçlandığı için CaCl₂ kitozan çözeltisi içinde çözülmüş ve aljinat çözeltisi ile bu çözelti içerisinde etkileşime girmesi sağlanmıştır.

Eklenmiş CaCl_2 miktarının, jelin kurutulmasından sonra oluşması beklenen film yapısını da sertleştirecek bir miktarda olmasını engellemek için yapılan ön denemeler sonucunda formülasyonun son hacminin (20 mL) % 1'i (a/h) kadar CaCl_2 'nin formülasyona ilave edilmesi uygun bulunmuştur.

Çalışmada aljinat ve kitozanın birbiri ile karıştırılması için manyetik karıştırıcı ve UltraTurrax homojenizatör denenmiş fakat oluşan kompleks yapı homojen şekilde dağıtılamamıştır. Homojen karıştırmayı sağlayabilmek için kitozan çözeltisi enjektör yardımıyla aljinat çözeltisi içerisine damla damla eklenip prob sonikatörle karıştırılmıştır. Ardından oluşan bu karışımın istenilen homojen yapıya getirilebilmesi için tekrar UltraTurrax ile karıştırılmıştır (Bölüm 2.2.4.3) (Şekil 2.3).

Hazırlama yöntemine karar verildikten sonra istenen kompleksasyonun homojen olması ve istenen film özelliklerine sahip formülasyonun elde edilebilmesi için formülasyon parametreleri üzerinde değişiklikler yapılmıştır. Öncelikle eşit hacimde (10'ar mL) ve eşit derişimde (% 0,5 veya % 1) aljinat ve kitozan çözeltilerinin karıştırılması denenmiş (Çizelge 2.10), oldukça viskoz bir karışım elde edilmiştir. Bu aşırı viskozite artışının sebebi kitozan ve aljinatın aynı hacimde kullanılmasıyla tüm polimerin kompleks haline gelmesi ve ortamda film yapısını oluşturabilecek serbest polimer kalmaması şeklinde açıklanabilir. Alsharabasy ve ark. (2016) da bu bulguyu destekleyecek şekilde, kendi çalışmalarında kompleksasyon reaksiyonuna girmemiş polimerin koaservat oluşumunu destekleyen film ortamını oluşturduğunu, bu nedenle farklı miktarlarda polimerin bir araya getirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (Alsharabasy ve ark., 2016). Bu sebeple polimer derişimi ve hacminin değiştirilerek formülasyonların hazırlanmasına karar verilmiştir.

Formülasyonlar aljinat çözeltisinin hem orta hem düşük molekül ağırlıklı kitozanla eşit derişimde (% 1, % 2 ve % 3) fakat yüksek kitozan hacmi (AC14-AC19) (15 mL MC veya LC, 5 mL aljinat çözeltisi) (Çizelge 2.11) veya yüksek aljinat hacmi (AC20 – AC25) (15 mL aljinat, 5 mL MC veya LC çözeltisi) (Çizelge 2.12) kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra kitozanın (Çizelge 2.13) veya aljinatın (Çizelge 2.14) derişimi sabit tutularak formülasyonlar hazırlanmıştır.

4.2.3.1. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarında DSC ve FTIR Analizlerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

DSC ve FTIR analizleri Bölüm 2.2.4.3.1’de anlatılmış olduğu şekilde gerçekleştirilmiş ve analizlerin sonuçlarına ait bulgular Şekil 3.12 ve Şekil 3.13 ile gösterilmiştir.

DSC analizlerine göre elde edilen termogramlarda klindamisin fosfata ait termogramda 199,13 °C’deki endotermik pik ve sonrasında maddenin dekompozisyonu gözlenmiştir. Aljinata ait egzotermik pik ise 251,53 °C’de gözlenmiştir. Termogramda kitozana ait pikin literatürle uyumlu şekilde 280 °C’den sonra oluştuğu gözlenmiştir (Kilicarslan ve ark., 2014b; Sankalia ve ark., 2007). Oluşturulmuş olan kompleks filmlerde ise ne etkin maddeye ne de kullanılan polimerlere ait endotermik veya egzotermik bir pik gözlenmemiştir (Şekil 3.12). Bu durum etken maddenin kompleks film içerisinde kristal formada olmadığını, amorf hale geçtiğini göstermektedir.

FTIR analizlerine göre, klindamisin fosfatın pik noktaları iskelet titreşimlerinin varlığında, 1600 cm^{-1} ve 600 cm^{-1} arasındaki parmak izi bölgesinde gözlenmiştir (Şekil 3.13.a). Bu bölgedeki bant grubu (1566,3 cm^{-1} ve 1519,9 cm^{-1}) C=C bağının gerilme titreşimleri ile ilişkilidir (Şekil 3.13.a, e, f ve g) (Patel ve Patel, 2015; Tamaddon ve ark., 2015). Orta molekül ağırlıklı kitozana (Şekil 3.13.b) ve düşük molekül ağırlıklı kitozana (Şekil 3.13.c) ait 1651,1 cm^{-1} ve 1597,1 cm^{-1} civarında bulunan pikler, sırasıyla N–H grubunun amid I ve amid II bantları ile ilgilidir (Sun ve diğerleri, 2018). Şekil 3.13.d ile gösterilmiş olan spektrumda 1612,5 cm^{-1} ve 1419,7 cm^{-1} ’de yer alan pikler, sodyum aljinat için –C– ve –COOH gerilme titreşimleriyle ilgilidir (Kilicarslan ve ark., 2018). Polielektrolit kompleks oluşumundan sonra, 1651,1 cm^{-1} ve 1597,1 cm^{-1} ’deki kitozana ait bantlar üst üste binmiş ve 1612,5 cm^{-1} ve 1419,7 cm^{-1} ’de sodyum aljinata ait pikler genişlemiş ve AC15’te 1651,1 cm^{-1} ve 1458,2 cm^{-1} ’e (Şekil 3.13.e), AC21’de 1627,9 cm^{-1} ve 1458,2 cm^{-1} ’e (Şekil 3.13.f) ve AC18’de 1635,7 cm^{-1} ve 1458,2 cm^{-1} ’e (Şekil 3.13.g) kaymıştır. Bantlardaki kayma ve genişleme, kompleksleşmeden sonra protonlanmış

aminlerdeki asimetrik ve simetrik N–H deformasyon titreşimleri, amid I ve amid II bantlarındaki ve karboksilat iyonlarına ait asimetrik gerilme titreşimleri ile açıklanabilir (Gierszewska ve ark., 2018; Yan ve ark., 2001). –COOH gruplarına karşılık gelen piklerdeki değişimler aljinat için kompleksleşmeyi göstermiştir (Mirtic ve ark., 2018). Literatüre göre (Mirtic ve ark., 2018), asimetrik C=O gerilmesine ait pik, iki değerli iyonların varlığında daha yüksek bir değere kayabilir (Ca^{+2} için 1635 cm^{-1} olarak verilmiş değer bizim bulgularımızla uyumludur). 1419 cm^{-1} 'deki bant da daha yüksek bir değere kaymış, çapraz bağlayıcı ile aljinat arasındaki etkileşimi yeniden göstermiştir (Kilicarslan ve ark., 2018). Sonuç olarak IR bulguları kompleksasyon oluşumunu kanıtlar şeklindedir.

4.2.3.2. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarında Viskozite, Kalınlık, İşlem Etkinliği, Yüzey Özellikleri ve Şişme Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Film formülasyonlarının kurutulmadan önceki viskoziteleri incelendiğinde derişim artışı ile her bir grup kendi içinde olmak üzere (Çizelge 2.11 – Çizelge 2.14) viskozitenin artmış olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.9). Kompleks film formülasyonlarının kalınlıkları $445,0 \pm 33,91\text{ }\mu\text{m}$ (AC14) ve $1903 \pm 254,9\text{ }\mu\text{m}$ (AC27) aralığındadır. 15 mL orta molekül ağırlıklı kitozan (AC16 ve AC27) ve düşük molekül ağırlıklı kitozan (AC18 ve AC19) ile hazırlanan formülasyonlar Şekil 3.30 ile gösterilmiş olduğu gibi yüksek pürüzlülüğe sahiptir. Kullanılan aljinat:kitozan çözeltisi hacminin değiştirilmesi ile elde edilen filmlerin (AC14 ve AC20; AC15 ve AC21; AC16 ve AC22) ortalama kalınlık değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamış olsa da ($p > 0,05$), yüksek pürüzlülüğe sahip filmlerin kalınlık değerlerinin arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (AC16, AC27, AC18 ve AC19) ($p < 0,05$) (Çizelge 3.9). Aljinat ve düşük molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan formülasyonlarda, aljinat hacmi kitozan hacminin 3 katı iken (15 mL) diğer formülasyonlara göre daha düzgün bir yüzey elde edilmiştir (AC23-AC33) (Şekil 3.30).

Hacmin kompleksasyon oluşumu üzerindeki etkisinin incelenmesi için orta molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak sabit aljinat : kitozan (% 2 : % 2) derişiminde hazırlanmış olan AC15 (15 mL kitozan ve 5 mL aljinat) ve AC21 (5 mL kitozan ve 15 mL aljinat) formülasyonlarının SEM görüntüleri incelenmiştir (sırasıyla Şekil 3.30 ve Şekil 3.31). Şekil 3.31’de görüleceği gibi AC21 formülasyonunda film içinde mikropartiküler koaservatların meydana geldiği gözlenmiştir.

Çizelge 3.12 ile gösterilmiş olduğu gibi formülasyondaki toplam aljinat ve kitozan derişimi arttıkça işlem etkinliği de (AC14 (%56,6 ± 6,84) ve AC16 (% 74,7 ± 14,7) ; AC 20 (% 71,5 ± 6,61) ve AC 22 (% 79,4 ± 10,4)) artmıştır. Ancak, film formülasyonlarının % işlem etkinliğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Yan ve ark. (2001), kitozan zincirindeki amino grupları aljinat zincirindeki karboksil gruplarına yakın olduğunda koaservasyonun daha kolay oluştuğunu, başka bir deyişle, polimerin molekül ağırlığı düşük olduğunda, reaksiyon daha kolay ilerlediğini belirtmişlerdir. Aljinat ve kitozan ile oluşturdukları kompleksasyon çalışmaları sonucunda da düşük molekül ağırlıklı kitozan ile oluşturdukları kompleks film yapısının orta molekül ağırlıklı kitozan ile oluşandan daha düzgün olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da aljinat-düşük molekül ağırlıklı kitozan karışımıyla daha homojen ve daha süt benzeri jeller elde edilmiştir. Ayrıca, düşük molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan formülasyonlar kendi aralarında incelendiğinde, 5 mL kitozan (AC23-AC33) ile hazırlanan filmlerin daha homojen olduğu sonucuna varılmıştır. Öte yandan, hazırlanan formülasyonlarda düşük molekül ağırlıklı kitozanın derişimi % 1'den yüksek olduğunda daha dokulu filmlerin oluştuğu Şekil 3.30’da görülebilmektedir. Bu sonuçlar, diğer bazı araştırmacılar tarafından da ifade edildiği gibi, kitozan ve aljinatın miktarının, derişiminin ve hacim oranının, molekül ağırlığı ve polimer zinciri ile birlikte kompleks yapısının oluşumunu etkilediğini ortaya koymuştur (W. Sun ve ark., 2018; Unagolla ve Jayasuriya, 2018; Yan ve ark., 2001).

Kompleks filmlerin şişme özellikleri incelendiğinde ise eşit derişimde 15 mL aljinat ve 5 mL kitozan çözeltisi ile hazırlanmış formülasyonlar (AC20-AC22 ve AC23-AC25), aljinatın yüksek su tutma kapasitesi dolayısıyla iki saat içinde çözünmüş, yapının bütünlüğü korunamadığı için şişme dereceleri tespit edilememiştir (Çizelge 3.12). En düşük % şişme dereceleri, 5 mL aljinatın kullanıldığı AC14 (% $88,10 \pm 542$), AC17 (% $44,70 \pm 12,9$) ve AC26 (% $17,30 \pm 7,75$) formülasyonları ile elde edilmiştir. Bununla birlikte, 15 mL aljinat ve 5 mL kitozan kullanılan ve aljinat:kitozan derişimi 2:1 (AC28 ve AC32) ve 3:1 (AC29 ve AC33) olduğunda, Conzatti ve ark. (2017)'nin da belirtmiş olduğu gibi, en yüksek şişme dereceleri elde edilmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 3.12) (Conzatti ve ark., 2017).

4.2.3.3. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarının Mikro-BT ile Yapısal Analizine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

AC15, AC18, AC21 ve AC33 formülasyonlarına ait kesitlerin mikro-BT görüntüleri, Şekil 3.33 - Şekil 3.35 ile gösterilmiştir. Üç boyutlu görüntüler elde edildikten sonra film numunesinin toplam hacmi (TV), film içerisinde oluşturulmuş koaservat hacmi (Obj.V) ve şekil faktörü (SMI), film numunesi içerisindeki koaservatın kapladığı hacmin % olarak değeri (% Obj.V/TV), maksimum ve minimum boyut, NRecon ve CTAn yazılımları kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.18). Elde edilen 3D görüntüler ile film içerisinde oluşan koaservatların küresel yapıya yakın olduğu görülmüştür. SMI değerlerine göre de analiz edilen tüm filmin plaka benzeri (SMI = 0,03-0,21 arası) ve film içerisinde dağılmış koaservatların da plaka ve çubuk yapısı arasında bir yapıda olduğu (SMI = 1,75-1,23 arası) belirlenmiştir. Eşit derişimde (% 2 : % 2) kitozan (15 mL) ve aljinat (5 mL) çözeltisi kullanılarak oluşturulan film formülasyonları (AC15 ve AC18) içerisinde oluşturulmuş koaservatlar kıyaslandığında düşük molekül ağırlığındaki kitozan ile oluşturulmuş koaservatların (AC18) ortalama boyutunun 3 kat daha küçük olduğu belirlenmiştir (224 μ m) (Çizelge 3.18) (Şekil 3.33). Aljinat çözeltisi hacmi 15 mL, kitozan çözeltisi hacmi 5 mL ve polimer derişimleri % 2 iken oluşturulmuş film (AC21) (% 8,51) içerisindeki koaservatın taranan tüm film içerisindeki yüzdesi (Obj.V/TV), 15 mL kitozan 5 mL

aljinat kullanılarak hazırlanmış film (AC15) (% 6,19) içerisindeki koaservat yüzdesinden daha fazladır (Çizelge 3.18) (Şekil 3.34). Ayrıca ortalama koaservat çapı da yaklaşık üç kat daha küçüktür (AC21 için 289 µm, AC15 için 682 µm). Bu veriler hem düşük molekül ağırlıklı kitozanla hem de daha yüksek hacimdeki aljinatla daha küçük boyutta koaservatların oluşturulabileceği fikrini doğurmuştur. AC 33 formülasyonu ile de elde edilmiş 3D görüntü (Şekil 3.35) ve elde edilmiş ve % Obj.V/TV (% 38,1) değeri ile bu fikir desteklenmiştir. Bu analizler kompleks film yapısının mikro-BT ile 3D görüntüleme sayesinde daha net bir şekilde anlaşılmasının mümkün olabileceğini kanıtlamıştır. İlaç taşıyıcı sistemlerde mikro-BT ile daha önce böyle bir inceleme yapılmamış olup, çalışmamızda elde edilen bu sonuçlar literatürde bir ilk olup, araştırmacılara ileride yapılacak çalışmalarını için örnek teşkil edebilecektir.

4.2.3.4. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarının *In vitro* Adezif Özelliklerin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda hazırlanmış olan PEC filmler hem periodontal cep içine uygulanması hem de implant sonrası cerrahi bölgeye uygulama düşünülerek tasarlanmıştır. Lokal periodontal formülasyonların dokusal (tekstür) özellikleri, sadece uygulama bölgesinde dayanıklılığı sağlamak için değil, aynı zamanda hasta uyuncunda da önemli bir rol oynamaktadır. Aljinat ve kitozanla oluşturulan polimerik kompleksler, bu polimerlerin doku uyumluluğunun yanı sıra formülasyonun uygulama bölgesinde uzun süre kalabilmesinin sağlanması için adezif özellikleri de göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Kompleks filmlerin *in vitro* adezif özelliklerine ilişkin veriler Çizelge 3.17 ile gösterilmiştir. Bu değerler Şekil 3.29 ile gösterilmiş olduğu üzere, elde edilen grafikteki pik noktası (adeziflik) ve grafikteki eğri altındaki alan (adezyon işi) değerleri hesaplanarak bulunmuştur. Verilere göre polimer tipi, formülasyonların adezif özelliklerini oldukça etkilemiştir. Aljinat çözeltisi hacmi düşük tutulduğunda, orta molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan filmler (AC14-AC16), düşük molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan filmlere (AC17-AC19) kıyasla daha yüksek adezyon göstermiştir. Düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan filmlerde, aljinat yüksek hacimde kullanıldığında daha yüksek adezyon

göstermişlerdir (AC23-AC25). Ayrıca, düşük hacimli aljinat çözeltisi ile hazırlanan tüm filmlerde nispeten zayıf adezif özellik gözlenmiştir (Çizelge 3.17). Bu sonuçlar, polimerler arasında meydana gelen iyonik kompleksasyon miktarı ile açıklanabilir. Literatüre göre, kitozan ve aljinik asit neredeyse eşdeğer miktarda iyonik gruba sahiptir (kitozan üzerindeki amino gruplarının miktarı, aljinattaki karboksil gruplarının miktarına neredeyse eşdeğerdir). Bu gruplar kompleks oluşturduktan sonra, adezif ve esnek bir film yapısının sağlanması için kitozan veya aljinatın bir kısmının tepkimeye girmeden kalması gerekmektedir (Meng ve ark., 2010). Bu durumda aljinat düşük miktarda kullanıldığında, kompleks filmin adezif özellikleri kitozana bağımlı olur.

Lai ve ark. (2003), kitozan ve aljinat ile kompleks yapının oluşması ile kopma kuvvetinin önemli ölçüde düştüğünü, Miyazaki ve ark. (1995), kitozan-aljinat tabletlerde, aljinat oranının formülasyonlarda arttırılmasıyla daha adezif tabletlerin elde edildiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde, hacimdeki ve aljinat derişimindeki artış, çalışmamızdaki filmlerin adezif özelliklerini olumlu yönde etkilemiştir (Lai ve ark., 2003; Miyazaki ve ark., 1995).

% 2 ve % 1 derişimdeki 15 mL kitozan çözeltisi ve % 2 derişimde 5 mL aljinat çözeltisi ile hazırlanmış AC15 ve AC26 formülasyonları için kopma kuvvetleri arasındaki farkın (sırasıyla $0,454 \pm 0,118$ ve $1,275 \pm 0,468$) anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Adezyon, düşük molekül ağırlıklı kitozanla oluşturulmuş tüm formülasyonlarda en düşük kitozan ve en yüksek aljinat miktarı (AC25 ve AC33) kullanıldığında önemli bir artış göstermiştir ($p < 0,05$). Ayrıca, AC20 ve AC27 hariç, toplam aljinat derişimindeki artış ile adeziflik artmış ve aljinat ve düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan formülasyonlar daha iyi adezif özellikler göstermiştir (AC32 ($1,047 \pm 0,330$ N), AC33 ($1,530 \pm 0,408$) ve AC40 ($1,113 \pm 0,032$)).

Wong ve ark. (1999) kitozanın aljinata kıyasla bu zayıf adezif özelliğinin, adezyon mekanizmalarındaki farklılıklarla açıklanabildiğini ifade etmiştir (Wong ve ark., 1999). Aljinat, yapısındaki -COOH fonksiyonel grupları nedeniyle hidrojen bağı ile orta derecede mukoadezif özelliğe sahip olan bir anyonik polimerdir. -NH₂

fonksiyonel gruplarına sahip katyonik bir polimer olan kitozan, adeziv özelliklerini, mukus veya müsinin negatif iyonları ile iyonik olarak etkileşime girerek adeziv özellik göstermektedir (Andrews ve ark., 2009). Kitozan ve aljinatın iyonik yüzleri arasındaki denge, pH seviyesindeki çeşitlilik nedeniyle değişmiştir. pH seviyesi yüksekse, poliyonik kompleks difüzyon yoluyla suyu emebilir ve kompleksin içindeki aljinatın -COOH grupları düşük pKa değerli aljinik asit nedeniyle iyonize edilebilir (pKa = 3,38–3,65). Ek olarak, matris membran iyonik bir jel gibi davranabilir. Bunun aksine, kitozanın arta kalan -NH₂ grupları düşük pH değerlerinde (pH 6,0 altında) protonlanıp -NH³⁺ 'ya dönüşebilir ve böylece iyonik etkileşim artar. Ortamın pH seviyesi, kitozanın pKa değerinin üzerindeyken, iyonlaşma derecesi ve polimerin adezivliği azalır (Meng ve ark., 2010; Shu ve ark., 2001).

Çalışmamızda, aljinat filmlerin adeziv özellikleri, kitozandan daha etkili bulunmuştur. Aljinat yüksek hacimde kullanılırken, düşük miktarda düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılan formülasyonların (AC25 (1,774 ± 0,315 N ve 0,180 ± 0,027 N.mm) ve AC33 (1,530 ± 0,408 N ve 0,127 ± 0,047 N.mm)) adeziv özellikleri en iyi olan formülasyonlar olduğuna karar verilmiştir (Çizelge 3.17).

4.2.3.5. Aljinat-Kitozan Kompleks Film Formülasyonlarının *In vitro* Çözünme Hızı ve *In vitro* Salım Kinetiklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Farklı kompleks film formülasyonlarından elde edilen etken madde çözünme hızı profilleri Şekil 3.21 - Şekil 3.28'de gösterilmiştir. Eşit oranda aljinat ve kitozan ile hazırlanan formülasyonlarda, iki farklı molekül ağırlığındaki kitozan için de toplam polimer miktarı % 1 (AC14 ve AC17) 'den % 2 (AC15 ve AC18) veya % 3 (AC16 ve AC19)' e yükseldiğinde azalan etken madde çözünme hızı tespit edilmiştir (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22). Kitozanın hem moleküler ağırlığının hem de derişiminin artması, ve aljinatın hacminden daha yüksek bir hacimde formülasyona ilave edilmesi ile, etken madde çözünme hızında azalma gözlenmiş ve en yavaş salım, bu formülasyon grubunda AC16 ile elde edilmiştir (Şekil 3.21). Aljinat çözeltisinden üç kat daha yüksek hacimde orta molekül ağırlıklı kitozan kullanıldığında ve polimer

konsatrasyonları % 3 olduğunda daha yüksek polielektrolit kompleks oluşumu ve çözünme ortamının pH değerinde kitozanın daha düşük çözünürlüğü olması sebebi ile daha yavaş bir etken madde salımı gözlenmiştir (Unagolla ve Jayasuriya, 2018; Yan ve ark., 2001).

Bu durumun aksine, her iki kitozan tipi için de, eşit derişimlerdeki 15 mL aljinat ve 5 mL kitozan çözletisi kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda, derişimin % 1'den (AC20 ve AC23) % 2'ye (AC21 ve AC24) çıkması ile daha hızlı etken madde salımı elde edilmiştir (Şekil 3.23 ve Şekil 3.24). Bu sonucun sebebi, aljinatın pH 6,75 çözünme ortamında daha yüksek çözünürlük ve şişme kabiliyeti göstermesi olabilir. Bu formülasyonlarda polielektrolit kompleks oluşumu gözlenmiş olsa da (Şekil 3.30), aljinatın hızlı su tutma kabiliyeti ve hızlı çözünmesi sebebiyle bu formülasyonların % şişme dereceleri de hesaplanamamıştır (Çizelge 3.12).

Diğer yandan, Şekil 3.23 ve Şekil 3.24 kıyaslandığında görülebileceği gibi, aljinat ve düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak oluşturulmuş polielektrolit komplekslerden (AC23-AC25) etken maddenin salımı, bu formülasyonların tamamı için sekiz saate kadar uzatılabilmiştir. Bu sonuç, düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda kompleksasyon oranının düşük derişimlerde da daha fazla olduğunu desteklemiştir (Conzatti ve ark., 2017; Unagolla ve Jayasuriya, 2018; Yan ve ark., 2001).

Aljinat miktarının kompleks oluşumuna ve dolayısıyla etken madde çözünme hızına etkisi Şekil 3.25 ve Şekil 3.26 ile gösterilmiştir. Sabit derişimde (% 1) orta molekül ağırlıklı kitozan (Şekil 3.25) veya düşük molekül ağırlıklı kitozan (Şekil 3.26) ile aljinat hem artan derişim hem de 15 mL hacimde kullanıldığında, etken madde salımının yavaşlatılabildiği belirlenmiştir. AC29 (orta molekül ağırlıklı kitozan ve 15 mL % 3 aljinat) ve AC33 (düşük molekül ağırlıklı kitozan ve 15 mL % 3 aljinat) formülasyonları ile etken maddenin 10 saate kadar salınabildiği ve ilk çıkış etkisinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Aljinatın daha fazla miktarda olması, bazı araştırmacıların da bahsetmiş olduğu gibi kitozan ile kompleksasyonu arttırmıştır (Unagolla ve Jayasuriya, 2018). Değerlendirilmiş bu iki formülasyon da

karşılaştırıldığında düşük molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanmış olan formülasyonda daha yavaş salım gözlenmiş olup bu da kompleks oluşumunun bu tip kitozanla daha fazla sağlandığını göstermektedir.

Kitozan miktarının kompleks oluşumuna etkisi ise Şekil 3.27 ve Şekil 3.28 ile gösterilmiştir. Sabit derişimde (% 1) aljinat ve artan derişimde orta molekül ağırlıklı kitozan (Şekil 3.27) veya düşük molekül ağırlıklı kitozan (Şekil 3.28) kullanılarak hazırlanan formülasyonlarla da düşük molekül ağırlıklı kitozanın en yüksek derişimde ve aljinatın 15 mL hacimde kullanıldığı formülasyon ile en yavaş salım elde edilmiştir.

Polielektrolit kompleks filmlerin uyum sağladığı kinetik modelinin değerlendirilmesi için klindamisin fosfat salımından elde edilen veriler sıfır derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modellerine ait eşitliklere yerleştirilmiş ve etken madde çözünme hız sabiti (k), determinasyon katsayısı (r^2), difüzyonal sabit (n) ve artık kareler toplamı (RSS) gibi bazı kinetik model parametreleri SPSS 20 programı kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.13- Çizelge 3.16). Yüksek r^2 ve küçük RSS değerleri etken madde salım profilinin uyduğu kinetik modelini işaret etmektedir. Sıfır derece kinetik modelini tanımlayan denklem Eşitlik 4.1, Higuchi modelini tanımlayan denklem Eşitlik 4.2 ve Korsmeyer-Peppas modelini tanımlayan denklem Eşitlik 4.3 ile gösterilmiştir.

$$Q_t = Q_0 - (k_0 t) \quad \text{Eşitlik 4.1.}$$

$$M_t/M_{inf} = k_H t \quad \text{Eşitlik 4.2.}$$

$$M_t/M_{inf} = k t^n \quad \text{Eşitlik 4.3.}$$

Q_t , t anında çözünmeden kalan etken madde miktarı; Q_0 , başlangıçtaki etken madde miktarı; M_t , t anındaki kümülatif çözünen etken madde miktarı; M_{inf} , sonsuz zamandaki çözünen etken madde miktarı; k_0 , k_H ve k , kinetik sabitleri; t , zaman; n , difüzyonal sabittir.

Tüm formülasyonlar için, Higuchi kinetik modelinin r^2 değerleri yüksektir. Higuchi modeli, matris sistemlerden etken madde çözünme hızını tanımlar ve difüzyon kontrollü salımın bir göstergesidir (Costa ve Sousa Lobo, 2001; Phaechamud ve Setthajindalert, 2017; Siepmann ve Peppas, 2001; Unagolla ve Jayasuriya, 2018). En düşük RSS değerleri yüksek r^2 ile birlikte Korsmeyer-Peppas modelinden elde edilmiştir. Sonuç olarak, en uygun kinetik Korsmeyer-Peppas modeli olarak bulunmuştur. Bu kinetik model etken maddenin % 60' ı açığa çıkana kadar geçerlidir.

Film yapısındaki salım sistemleri için, Korsmeyer-Peppas modeline göre, difüzyonal sabitin $n = 0,5$ olması difüzyon kontrollü etken madde salımı için bir göstergedir (Fick difüzyon mekanizması). $n = 1$ olması sıfır derece kinetiğini (case II), n değerinin 0,5 ile 1 arasında olması ise her iki fenomenin üst üste bindiğini (anomali, non-Fick) (şişme kontrollü etken madde salımı) ifade eden bir gösterge olarak kabul edilebilir. Küresel salım sistemleri için ise $n = 0,43$ difüzyon kontrollü etken madde salımı, $0,43 < n < 0,85$ non-Fick ve $n = 1$ sıfır derece salım mekanizmasının göstergesidir. Çalışmada AC18, AC29, AC32-AC35, AC37-AC41 formülasyonları dışındaki tüm formülasyonlar, 0,5 ile 1 arasında n değerlerine sahiptir (anomali). 3D mikro-BT görüntülerinde görülen film yapısı içinde dağılmış polielektrolit kompleksin küresel şekli nedeniyle, AC21, küresel şekiller için kullanılan $0,43 < n < 0,85$ için değerlendirilmiş ve sonuç olarak, AC21'in ($n = 0,788$) n değeri, sıfır derece kinetik sınırına oldukça yakın bulunmuş ve böylece Higuchi ($r^2 = 0,973$) ile birlikte sıfır derece kinetiğe de ($r^2 = 0,951$) uyum sağladığı düşünülmüştür. AC20 – AC22 ve AC23 – AC25 formülasyonları, daha önce belirtildiği gibi formülasyon içeriğinden dolayı hızlı bir şekilde şişme ve parçalanma gösterdiği için, en yüksek n değerine (0,716 ile 0,788 arasında) sahiptir ve bu formülasyon grubunun salım mekanizması anomali (non-Fick) salım mekanizmasına uygundur (Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14).

AC32 ve AC33 en yüksek şişme derecesini gösterse de (Çizelge 3.12), anomali yerine Fick difüzyon mekanizmasına uyum göstermişlerdir (AC32 ve AC33 için sırasıyla $n = 0,338$ ve $n = 0,399$). Bazı araştırmacılar tarafından da belirtilmiş olduğu gibi, poli dispers sistemlerde Fick difüzyon mekanizmasında $n < 0,43$ de mümkündür

(Ritger ve Peppas, 1987; Siepmann ve Peppas, 2001; Siepmann ve Siepmann, 2008; Unagolla ve Jayasuriya, 2018).

Belirli zaman aralıklarında hazırlanmış olan film formülasyonlarının renk, boyut, sertlik gibi özellikleri kontrol edilmiş bir farklılık gözlenmemiştir.

4.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Literatürde nanopartikül üretimi için denenmiş ve başarıya ulaşılmış birçok yöntem olsa da suda çözünen etken maddelerin polimerik bir yapı içerisine hapsedilebilmesi için genellikle çoklu emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle antibiyotikler ve proteinik maddeler için bu yöntem oldukça avantajlıdır (Devrim ve Bozkir, 2017; Varan ve ark., 2017; Ye ve Chi, 2018). Bizim de çalışmamızda suda çok iyi çözünürlükleri olan klindamisin fosfat ve/veya BMP yüklü nanopartiküller oluşturulması hedeflendiği için elde edilmiş literatür bilgisi ile çoklu emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi üretim yöntemi olarak seçilmiştir.

Suda çözünen bir etken madde için kullanılan çoklu emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yönteminde genel olarak etken madde ilk su fazı içerisinde, polimer ise organik çözücüde çözülür. Daha sonra bu iki çözelti su fazı yağ fazı içerisine damla damla ilave edilerek bir sonikatör yardımıyla homojenize edilir. Oluşan bu s/y emülsiyonu daha sonra sürfaktan içeren ikinci bir sulu çözelti içerisinde homojenizatör yardımıyla disperse edilerek s/y/s çoklu emülsiyonu oluşturulur. Dış su fazı olarak en çok PVA'nın farklı molekül ağırlığı kullanılarak farklı derişimlerde hazırlanmış çözeltileri kullanılmaktadır. Çünkü PVA, oluşturulmuş bu sistemler için iyi bir stabilizandır. Oluşturulmuş olan bu emülsiyon sisteminin organik çözücü uzaklaşınca kadar stabil kalması yükleme etkinliği ve partikül büyüklük dağılımının homojenliği açısından oldukça önemlidir. Fakat PVA'nın sitotoksik etkileri

gözlenebildiği için mümkün olan en az miktarda PVA içeren dış su fazının kullanılması bazı araştırmacılar tarafından da önerilmiştir (Sahin ve ark., 2017).

Çalışmamızda nanopartiküllerin üretimi için farklı molekül ağırlığına sahip PLGA (7-17 kDa, 24-38 kDa ve 76-115 kDa) ve PCL kullanılmıştır. Dış su fazının stabiliteyi sağlaması için de farklı derişimlerde PVA (31 kDa) kullanılmıştır (Chitkara ve Kumar, 2013). Nanopartikül formülasyon çalışmalarına öncelikle klindamisin fosfat yükleme işlemi ile başlanmıştır.

Çalışmaya ilk olarak % 1 (N1), % 3 (N2) ve derişimdeki PVA ile 24-38 kDa PLGA kullanılarak başlanmıştır (Çizelge 2.17). Hazırlanmış bu nanopartiküllerde N2 formülasyonu ile daha yüksek verim ve daha yüksek işlem etkinliği elde edilmiştir (sırasıyla % 74,33 ve % $21,68 \pm 1,040$) ($p < 0,05$) (Çizelge 3.20). N2 formülasyonu için partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel verileri değerlendirildiğinde ise partikül büyüklüğünün nano boyutu aşmış olduğu belirlenmiştir ($2018 \pm 432,1$ nm). Ayrıca bu formülasyon için PDI değerinin 0,7'nin üzerinde olması geniş bir partikül büyüklük dağılımının varlığını göstermektedir ($0,812 \pm 0,118$) (Çizelge 3.19). Çünkü PDI değeri 0,05'ten küçükse monodispers (sadece lateks standartları veya monodispers olması için yapılan partiküllerde karşılaşılır), 0,08'den küçükse neredeyse monodispers numuneyi ifade eder. $0,08 < PDI < 0,7$ aralığı PDI'nın orta aralık değerini ifade eder ve dağılım algoritmalarının en iyi çalıştığı aralıktır. PDI'nın 0,7'den büyük olması durumu da çok geniş boyut dağılımı olduğunu göstermektedir (Malvern, 2009).

Sudaki partikül süspansiyonları için, zeta potansiyeli, dispersiyon ortamı ile disperse edilmiş partiküle bağlanan sabit sıvı tabakası arasındaki elektriksel potansiyel farkıdır. Zeta potansiyeli, birbirine yakın ve benzer yüklü parçacıklar arasındaki itme derecesini gösterir. Yeterince küçük moleküller ve partiküller için, yüksek zeta potansiyeli (negatif veya pozitif) stabilite sağlar, yani partiküller agregasyona direnç gösterir. Potansiyel düşük olduğunda, çekim kuvveti itme kuvvetini aşar ve parçacıklar agrege olurlar (Doostmohammadi ve ark., 2011). N1 ve N2 formülasyonlarının zeta potansiyeli karşılaştırıldığında PVA derişiminin % 3'ten % 1'e düşürülmesi ile zeta

potansiyelde anlamlı bir artış gözlenmiştir (sırasıyla $-7,020 \pm 0,542$ mV ve $-14,67 \pm 0,058$ mV) ($p < 0,05$). Fakat bunun üzerine zeta potansiyel açısından da istenen bir sonuç elde edilebileceği görülünce partikül yüzeyinde PVA artık kalma ihtimalini de düşürebilmek için daha düşük derişimde PVA ile çalışılmasına karar verilmiş % 0,1; % 0,2 ve % 0,3 derişimlerde PVA hazırlanarak nanopartiküllerin üretimine devam edilmiştir.

N3 – N5 formülasyonlarının hazırlanmasında % 0,1 PVA kullanılmıştır. N4 formülasyonunda ilk oluşturulan s/y emülsiyonu dondurulmuş, böylece etken maddenin dış su fazına difüzyonunun engellenebileceği düşünülmüştür. Ito ve ark. (2012 ve 2014) yaptıkları çalışmada düşük molekül ağırlıklı ve hidrofilik bir etken madde olan izoniazid kullanarak hazırladıkları PLGA mikropartiküllerle yükleme etkinliğini % 60'a kadar çıkarabilmişlerdir (Ito ve ark., 2012; Ito ve ark., 2014). Fakat bizim çalışmamızda dondurularak (N4) ve dondurulmadan (N3) hazırlanan formülasyonları kıyaslandığında işlem etkinliği, partikül büyüklüğü, PDI veya zeta potansiyel değerleri açısından anlamlı bir fark elde edilememiştir (Çizelge 3.19).

Bunun üzerine iç faz pH'sı, pH 6 fosfat tamponu kullanılarak düşürülmüş, etken maddenin iç su fazındaki çözünürlüğü artırılarak dış su fazına kaçması engellenmeye çalışılmıştır (N5). Fakat yükleme etkinliği anlamlı şekilde azalmıştır. Bunun sebebinin de partikül boyutunun N3 ($608,3 \pm 213,6$ nm) ve N4 ($550,9 \pm 142,8$ nm)'e göre küçülmesi ($359,8 \pm 71,20$ nm) ile açıklanabilir.

Daha sonraki adımda farklı molekül ağırlığına sahip PLGA'lar ile birlikte % 0,2 derişimde PVA ile formülasyonlar hazırlanmıştır(N6 – N10) (Çizelge 2.18). Bu formülasyon grubu içinde, N6 (PLGA 24-38 kDa, 50:50 ester) formülasyonunun işlem etkinliği anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,05$). Fakat zeta potansiyeli de bu grubun içindeki en düşük değerdedir ($-4,183 \pm 1,509$ mV) ($p < 0,05$). Ayrıca düşük molekül ağırlıklı PLGA ile hazırlanan formülasyonların yükleme etkinlikleri orta ve yüksek molekül ağırlıklı PLGA'ya göre anlamlı derecede düşük olduğu için sonraki çalışmalar için kullanılmamasına kara verilmiştir.

Bunun üzerine % 0,3 derişimdeki PVA dış su fazı olacak şekilde, PCL veya orta ve yüksek moleköl ağırlıklı PLGA kullanılarak nanopartiköl formölasyonları hazırlanmıştır (N11-N15) (Çizelge 2.19). Farklı moleköl ağırlığındaki PLGA ve farklı yüzdede PVA ile hazırlanan N6-N15 formülleri, verim, işlem etkinliği, partiköl büyüklüğü ve dağılımı ve zeta potansiyeli açısından karşılaştırıldığında N11 formölasyonu ile en yüksek işlem etkinliği (% 32,51 ± 1,329) ve en yüksek verim (% 83,50) elde edilebildiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Ortalama partiköl büyüklüğü 551,0 ± 67,11 nm olan formölasyonun ve PDI değeri de 0,7'den küçüktür (0,331 ± 0,037). Zeta potansiyel değeri de bu grup içerisinde hazırlanmış formölasyonlar arasında en yüksek değere sahiptir (-25,53 ± 2,645 mV) ($p < 0,05$).

Polimer tipi ve PVA derişimine karar verildikten sonra dış su fazı pH değerinin (Çizelge 2.20) ve etken madde:polimer oranının (Çizelge 2.21) etkisi incelenmek üzere formölasyon denemeleri yapılmıştır. % 0,3 derişimde PVA çözeltisinin pH değeri 6,95 olarak bulunmuştur. Dış faz pH'sı 4 (N16), 10 (N17) ve 12'ye (N18) (sırasıyla 2N asetik asit ve 2 N NaOH ile) ayarlanarak pH'nın etkisi incelenmiştir. Çizelge 3.20'de gösterilmiş olduğu gibi pH 10 olduğu zaman yükleme anlamlı seviyede artarak % 44,89 ± 0,304'e ulaşmıştır. Bunun sebebinin klindamisin fosfatın pH 8 - pH 10 arasında en düşük çözünürlüğe sahip olması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca N17 formölasyonunun ortalama partiköl boyutunun aynı gruptaki diğer formölasyonlara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu (540,8 ± 139,4) Çizelge 3.19 ile gösterilmiştir.

Etken madde : polimer oranı incelendiğinde ise (1:5 (N11), 1:10 (N19), 1:2 (N20)) etken madde miktarının azalması veya artmasının işlem etkinliğini bir miktar düşürdüğü gözlenmiştir ($p > 0,05$) (Çizelge 2.21 ve Çizelge 3.20). N11 formölasyonuna göre işlem etkinliğinde en fazla azalma N19 formölasyonunda meydana gelmiştir. Miligram cinsinden yüklenmiş olan etken madde miktarları göz önüne alındığında ise 20 mg etken madde kullanılarak formölasyonun hazırlanmasının daha avantajlı olduğu anlaşılmıştır (N11:20 mg içinden 6,50 mg; N19: 10 mg içinden 2,03 mg; N20: 50 mg içinden 9,02 mg).

Çizelge 2.22 ile gösterilmiş tabloda yağ fazını oluşturan organik faz veya iç su fazını oluşturan çözücü ortamın değiştirilmesi ile hazırlanmış olan formülasyonlar yer almaktadır. N11 formülasyonunda kullanılan 1 mL DCM miktarı 5 ml'ye çıkarılınca % işlem etkinliği azalırken partikül boyutu artmıştır. Bunun sebebinin organik çözücünün fazla olmasından dolayı hızlı uzaklaşmaması dolayısıyla polimerin katılaşmaması ve, bu sebeple etken maddenin dış su fazına hızla difüze olması ve emülsiyondaki damlacık boyutunun zamanla artmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu sebeple işlem etkinliğinin artırılabilmesi için suyla karışabilen aynı zamanda PLGA'yı da çözebilen bir çözücü ile DCM'nin karıştırılması düşünülmüştür. Böylece dış su fazı içerisindeki emülsiyon oluşturulurken çözücünün bir kısmı suyla karışır, çözücü miktarı birden azaldığı için de polimer katılaşarak partiküllerin hızla oluşması sağlanabilir (Cheow ve Hadinoto, 2010). Bu sebeple DCM:aseton 75:25 oranında karıştırılmıştır. Fakat aseton klindamisin fosfat için de bir çözücüdür, bu nedenle emülsiyon oluşurken klindamisin fosfat aseton içinde de çözünmüştür. Aseton aynı zamanda suyla karışabilen bir çözücü olduğu için s/y emülsiyonu dış su fazına eklendiğinde aseton etkin maddeyi de beraberinde taşıyarak suyla karışmış, bu nedenle de işlem etkinliği de $9,560 \pm 1,856$ 'ya düşmüştür.

Bu veri üzerine DCM'ye yine suyla karışabilen fakat etken maddeyi çözmeyecek bir çözücü olarak metanolün eklenmesi uygun bulunmuş ve yine organik çözücünün % 25'i olacak şekilde metanol ilave edilmiştir. Fakat elde edilen partiküllerin işlem etkinliği arttırılamamış hatta zeta potansiyeli de $-7,890 \pm 0,551$ mV'ye düşmüştür.

Etken maddenin iç su fazındaki çözünürlüğünün arttırılması ve azaltılmasının etkisi incelendiğinde de sırasıyla % 0,1 PVA (N24) ve metanol (N25) kullanılmıştır (Çizelge 2.22). Elde edilen işlem etkinliği verilerine göre etken maddenin iç su fazında disperse edilmesi ile yükleme etkinliği bu formülasyon grubu içerisinde anlamlı derecede arttırılmıştır ($p < 0,05$). Ayrıca N25 formülasyonunun ortalama partikül boyutu $445,2 \pm 16,90$ nm ve PDI değeri 0,7'den küçük bulunmuştur ($0,518 \pm 0,032$). Ayrıca N25 formülasyonunun zeta potansiyeli de yine bu formülasyon grubu içinde anlamlı derecede en yüksek değere sahip olan formülasyondur ($-30,03 \pm 1,436$ mV) ($p < 0,05$).

Çizelge 2.23'te verilmiş olan ve dış su fazının değiştirilmesi ile elde edilmiş formülasyonlarda dış faz hacmi veya içeriği değiştirilmiştir. Bu amaçla su fazına hidrofilik yağ olarak adlandırılan gliserin ve propilen glikol eklenmiş ve formülasyonların özellikleri incelenmiştir. Gliserin ile dış faz yoğunluğu artırılarak etken maddenin çözünürlüğünün düşürülmesi hedeflenmiştir (N27 ve N28). Bu formülasyon grubu (N26-N28) içerisinde de gliserin ve % 0,3 derişimdeki PVA çözeltisi 50:50 oranında karıştırılarak kullanıldığında yükleme etkinliğinin (% $29,9 \pm 0,594$) ve verimin (% 77) anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Fakat ortalama partikül boyutu oldukça büyük zeta potansiyelinin de $-7,777 \pm 0,250$ mV olması sebebi ile uygun bir formülasyon olarak değerlendirilemeyeceğine karar verilmiştir.

Yükleme etkinliğinin arttırılabilmesi için son olarak iki farklı polimerin aynı formülasyonda kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanması denenmiştir. Bu amaçla ilk olarak düşük molekül ağırlıklı PLGA (7-17 kDa) kullanılarak s/y emülsiyonu oluşturulmuş ve bu sistem ikinci bir yağ fazı olan orta molekül ağırlıklı PLGA'nın (24-34 kDa) DCM içerisindeki çözeltisinde dağıtılmış ve son olarak dış su fazı içerisinde disperse edilmiştir. Yani s/y/y/s emülsiyonu oluşturularak iki katlı polimer tabakası oluşturulması ve bu sayede yüklemenin arttırılması hedeflenmiştir (N29). Benzer şekilde Devrim ve Bozkir (2013)'in yaptıkları çalışmada da s/y/y/s emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma sistemi ile hem ovalbuminin yükleme etkinliğini arttırabilmiş, hem de suda çözünür proteinik maddenin *in vitro* çözünme hızını iki aya kadar uzatabilmişlerdir (Devrim ve Bozkir, 2013). Aynı düşünce üzerinden yola çıkılarak s/y emülsiyonu 24-38 kDa PLGA kullanılarak hazırlanmış oluşan bu emülsiyon % 0,3 derişimdeki PVA ve % 0,5 derişimde orta molekül ağırlıklı kitozanın 50:50 oranda karıştırılması ile oluşturulmuş dış su fazı içinde dağıtılmıştır. Bu formülasyonda da kitozanla hem dış fazın yoğunluğu arttırılarak hem de oluşan PLGA partiküllerin kitozanla çevrelenmesi ile etken maddenin partikülden sızmasının engellenmesi ile yüklemenin arttırılabilceği düşünülmüştür (N30). N29 formülasyonu ile işlem etkinliği % $32,61 \pm 0,716$ 'ya çıkarılabilmıştır fakat N30 formülasyonu ile bu değer % $16,17 \pm 0,379$ 'da kalmıştır. Her iki formülasyon için de ortalama partikül boyutu artmıştır. Zeta potansiyel değerleri de N29 için $-23,81 \pm 0,218$ mV ve N30 için

32,00 ± 0,400 mV bulunmuştur. N30 için bulunmuş olan pozitif zeta potansiyeli değeri partiküllerin kitozan ile kaplanmış olduğuna işaret etmektedir.

Formülasyonların özelliklerinin incelenmesi sonucunda dış su fazı pH'sının 10 olarak ayarlandığı formülasyonlarda en optimum sonuçların elde edilmiş olduğu gözlenmiş ve bu aşamadan sonra yüklenecek proteinik BSA ve BMP-7 için de N17'nin ana formülasyon olarak seçilmesine karar verilmiştir.

BMP-7 yüklü nanopartiküllerle birlikte (N31-N34) (Çizelge 2.26) hem yükleme etkinliğinin değerlendirilebilmesi hem de salım profillerinin incelenebilmesi için model etken madde olarak kullanılan BSA ile formülasyonlar da hazırlanmıştır (NBSA1-NBSA4) (Çizelge 2.25). Bu formülasyonlarda hem klindamisin fosfat hem BSA veya BMP-7 yüklenmiş formülasyonlar için (NBSA2, NBSA4, N32 ve N34) her iki etken madde için ayrı ayrı işlem etkinliği analizi yapılmıştır (Çizelge 3.20 ve Çizelge 3.21). N32 ve N34, NBSA2 ve NBSA4 formülasyonlarının işlem etkinliği verileri kendi içlerinde kıyaslandığı zaman protein derişiminin artması ile klindamisin fosfatın işlem etkinliği anlamlı bir farkla artmıştır ($p < 0,05$). BSA ve BMP-7 için yüklenen etken madde yüzdeleri kıyaslandığında ise yükleme etkinliklerinin klindamisin fosfata göre çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu iki durumun da proteinin büyük molekül yapısından dolayı partikül içerisine yüklenen etken maddenin partiküllerin katılması aşamasında dış su fazına doğru kolaylıkla dışarı çıkamamasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Çizelge 3.21). Bu formülasyonlardan BMP-7 içerenlerin (N31-N34) ortalama partikül boyutları $571,9 \pm 34,21$ nm ve $616,7 \pm 50,83$ nm aralığında bulunmuştur. Ayrıca PDI değerlerine bakıldığında 0,7'den küçük olması bu formülasyonlar için mono modal bir dağılım elde edilmiş olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.19). BSA içeren formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü daha fazla olsa da PDI değerleri yine 0,7'den küçüktür. Tüm protein yüklü formülasyonlar için elde edilen zeta potansiyel değeri $-10,75 \pm 0,979$ mV ile $-28,07 \pm 0,252$ mV aralığında bulunmuştur.

4.3.1. Nanopartiküllerde Etken Madde ve Yardımcı Maddelerin Etkileşiminin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Nanopartikül formülasyonlarının, kullanılan etken madde ve PLGA'nın DSC analizleri ise Bölüm 2.2.5.2.1'de anlatılmış olduğu şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.36'da da gösterilmiş olduğu üzere klindamisin fosfata ait 198,94 °C'deki ve BSA'ya ait 218,4 °C'deki endotermik pik nanopartiküle ait DSC termogramında gözlenmemekte bu da etken maddelerin amorf halde polimerik yapının içerisine hapsedilmiş olduğunu göstermektedir.

4.3.2. Nanopartiküllerde *In vitro* Çözünme Hızı Deneyine ve Salım Kinetiklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Hazırlanmış olan nanopartikül formülasyonları arasından yükleme etkinlikleri en yüksek olanlar seçilmiş ve salım profilleri incelenmiştir. Nanopartiküller için *in vitro* çözünme hızı deneyinde önce diyaliz yöntemi kullanılmış fakat çözünen etken madde miktarının çok düşük olması sebebi ile hacmin 1 ml'ye düşürülmesi gerekmiş ve partiküllerin santrifüj yardımıyla ayrılarak süpernatanın alınması ve alınan tampon miktarı kadar yerine taze tampon ilave edilmesi uygun bulunmuştur (Savaser ve ark., 2018).

Şekil 3.37.a ile verilen salım profilinde N11 (ana formülasyon-1 mL iç faz) ve N12 (0,5 mL iç faz) ilk iki haftadaki klindamisin fosfat salımı görülmektedir. Bu profilde etken maddenin N12 formülasyonu ile daha yavaş salındığı gözlenmektedir. N11 ve N12 formülasyonlarının partikül büyüklükleri kıyaslandığında sırasıyla $551,0 \pm 67,11$ nm ve $286,6 \pm 8,895$ nm olması yüzey alanının artması ile N12'den daha hızlı salımın gözlenebileceğini gösterse de zeta potansiyelleri göz önüne alındığında (sırasıyla $-25,53 \pm 2,645$ mV ve $-16,57 \pm 0,153$) partiküllerin agregasyonu sonucu salımın yavaşlamış olabileceği düşünülebilir (Çizelge 3.19). Profilin Şekil.3.37.b ile gösterilen 3 aylık zamanı kapsayan hali göz önüne alındığında 42. günden sonra salım profilindeki artışın PLGA'nın degradasyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir.

İç su fazının değiştirilmesi ile hazırlanmış formülasyonlara ait *in vitro* klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri (N11 (ana formülasyon), N12 (iç su fazı 0,5 mL), N20 (50 mg klindamisin fosfat kullanılan formülasyon) ve N25 (klindamisin fosfatın metanolde dağıtıldığı formülasyon)) Şekil 3.38 ile gösterilmiştir. Burada da ilk iki hafta (Şekil 3.38.a) ve üç ay (Şekil 3.38.b) verileri kıyaslandığında 42. günden sonraki tüm formülasyonlarda etken maddenin açığa çıkış hızında artış gözlenmiştir. Formülasyonlar kıyaslandığında N20 formülasyonuna ait salım profilinde diğer formülasyonlara nazaran daha hızlı bir ilk çıkış etkisi gözlenmiş bunun sebebinin ise yüklenmeden kalan artık klindamisin fosfatın nanopartikülün yüzeyinde tutunması olduğu düşünülmüştür. Şekil 3.48 ile gösterilmiş olan bu formülasyona ait SEM görüntüleri de bu düşünceyi desteklemektedir. Fakat özellikle 8. hafta sonrasındaki veriler göz önüne alındığında bu üç formülasyon arasında etken madde salımı açısından bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Dış faz pH değerleri değiştirilerek hazırlanmış olan formülasyonlar etken maddenin çözünme hızı açısından değerlendirildiğinde ise N18 (pH 12) formülasyonunda ilk 7 günde % $16,45 \pm 3,67$ iken N17 (pH 10) formülasyonu ile ilk 7 gün içerisinde etken maddenin % $46,30 \pm 4,34$ 'ü çıkmış ve salım kontrollü olarak üç ay boyunca devam ettirilebilmiştir (Şekil 3.39). N18 ve N17 formülasyonları arasındaki salım hızı farkının bu derece yüksek olmasının ise N17'nin partikül büyüklüğü $540,8 \pm 139,4$ nm iken N18'in partikül büyüklüğünün on kat fazla $5067 \pm 945,7$ nm olması ve yüzey alanının da o derece azalmasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür (Çizelge 3.19).

Kullanılan polimerin değiştirilmesi ile (N11 (24-38 kDa PLGA), N15 (PCL), N29 (7-17 kDa ve 24-38 kDa PLGA)) hazırlanmış formülasyonlara ait *in vitro* klindamisin fosfat çözünme hızı grafikleri Şekil 3.40'ta verilmiştir. İlk iki hafta içerisinde N15 formülasyonu nispeten daha hızlı bir salım gösterse de sekizinci haftadan sonra ortalama % açığa çıkan etken madde miktarları birbirine yakınlaşmıştır. N29 formülasyonunda diğer formülasyonlara göre daha yavaş bir çıkış tespit edilmiştir. Diğer tüm formülasyonlarda da gözlenmiş olan 42. günden sonra çıkıştaki hızlı artış daha yumuşak bir geçişle gerçekleşmiştir. Bunun sebebinin formülasyonun

iki katlı PLGA ile oluşturulmuş olması ve bundan dolayı daha zor degrade olması olabileceği düşünülmektedir. Bu gruptaki tüm formülasyonlarda etken madde salımının % 40'ın altında olduğu da belirlenmiştir.

N17 formülasyonunun BSA gibi büyük moleküler yapıda bir maddenin ilavesi ile modifiye edilmesi ile (NBSA4) klindamisin fosfatın salım hızının nasıl etkileneceği incelenmiştir (Şekil 3.41). Her iki formülasyon için % açığa çıkan etken madde miktarına göre salım hızı BSA eklenmesi ile anlamlı şekilde azalmış ($p < 0,05$), bunun sebebinin ise Bölüm 4.3'te açıklanmış olduğu gibi büyük yapıdaki BSA molekülünün büyük yapısından dolayı partikül içerisine yüklenen etken maddenin su fazına doğru kolaylıkla dışarı çıkamamasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

BSA'nın nanopartikülden salım hızı kıyaslandığında ise salım hızı klindamisin fosfat ve BSA'yı birarada içeren nanopartikülün daha hızlı bir ilk çıkış etkisi göstermiş olduğu ve üç ay süre boyunca da daha fazla miktarda etken maddeyi açığa çıkarabilmesinin bir sebebi olarak klindamisin fosfatın da suda çok iyi çözünen bir etken madde olması ve hidrofilik yapısı sayesinde suyu çekmesi ve açığa çıkan klindamisin fosfatla birlikte açılan ince kanallardan daha fazla tamponun partikül içerisine girebilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Şekil 3.42).

Hem klindamisin fosfat hem de BSA içeren nanopartikülden (NBSA4) iki etken maddenin çözünme hızı grafiğine birlikte bakıldığında da BSA'nın yine molekül yapısının büyüklüğünden dolayı ortama daha yavaş salındığı Şekil 3.43 ile gösterilmiştir.

Salım kinetikleri incelendiğinde ise nanopartiküller için sıfır derece (Eşitlik 4.1), Higuchi (Eşitlik 4.2) ve Hixson-Crowell (Eşitlik 4.4) kinetik modellerine ait eşitlikler kullanılıp hesaplamalar yapılmış ve sonuçlar Çizelge 3.22 ile gösterilmiştir.

$$M_0^{1/3} - M_t^{1/3} = \kappa t$$

Eşitlik 4.4.

Eşitlikte M_0 başlangıçtaki etken madde miktarını, M_t , t anında kalan etken madde miktarını, t zamanı ve κ ise yüzey-hacim ilişkisini tanımlayan sabiti ifade etmektedir.

Çizelge 3.22 incelendiğinde N17 ve N29 formülasyonları hariç her üç kinetik model için de r^2 değerleri oldukça yüksektir. Fakat Hixson-Crowell modelinde tüm formülasyonlar için r^2 değeri yüksektir. Bunun için RSS değerleri değerlendirilmiş ve en düşük değer yine Hixson-Crowell modeliyle elde edilmiştir. Hixson-Crowell küp kök yasası, etken madde salımının partiküllerin yüzey alanındaki değişikliklerle meydana gelmesini açıklar. Burada, parçacıkların düzenli alanı, hacminin küp kökü ile orantılıdır. Dolayısıyla, çözünme işlemi sırasında yüzey alanındaki değişimin etken maddenin salımı üzerinde önemli bir etkisi olduğu yorumu yapılabilir (Baishya, 2017; Dash ve ark., 2010; Hixson ve Crowell, 1931).

Profillerde polimerin degradasyonuna bağlı olarak 3 basamaklı olarak farklı hızlarda etken madde çıkışının olması kinetik değerlendirmelerde tüm zamanların dahil edilmesi ile elde edilen hesaplamalarda determinasyon katsayısının düşmesine neden olmaktadır ve aslında her bir zaman diliminde kontrollü salım gözlenebilirken toplam değerler açısından tek başına sıfır derece kinetik uyumu gözlenmemektedir.

4.3.3. Nanopartiküllerin Görüntülenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerin farklı ölçek büyütmelelerinde SEM görüntüleri alınmış ve formülasyonların yüzey özellikleri incelenmiştir (Şekil 3.44 - Şekil 3.50). İncelenen tüm nanopartikül formülasyonlarının küresel yapıda olduğu gözlenmiştir. Özellikle Şekil 3.45 ile gösterilmiş N12 (0,5 mL iç su fazı) ve Şekil 3.48 ile gösterilmiş olan N20 (50 mg klindamisin fosfat içeren) formülasyonlarında etken madde kristallerinin varlığı gözlenmiştir. Ayrıca Şekil 3.50 ile gösterilmiş olan N34 formülasyonuna ait SEM görüntüleri Çizelge 3.19 ile verilmiş olan PDI değerini ($0,315 \pm 0,021$) destekler nitelikte homojen bir partikül boyutu dağılımının olduğunu kanıtlamaktadır.

Formülasyonlardan % 0,1 ve % 0,3 derişimde PVA ile hazırlanmış olan formülasyonların üç boyutlu mikto-BT görüntüleri incelenmek istenmiş fakat Şekil 3.51 ile gösterilmiş olduğu gibi, partiküllerin boyutlarının nanometre seviyesinde olmasından dolayı cihazın görüntüleme aralığının dışında kalmış ve net bir görüntüleme gerçekleştirilememiştir. Bunun üzerine % işlem etkinliği yüksek olan formülasyonlardan bazıları seçilmiş ve nano-BT taramaları gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde daha önce partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde daha önce yapılmamış olan bir analiz gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin nano-BT ile edilmiş görüntüleri Şekil 3.52 - Şekil 3.63 ile gösterilmiştir. Cihazdan alınan 2D eksenel görüntüler partiküllerin iç yapısının özelliklerini incelemek için kullanılabilirken, 3D görüntüleri sayesinde partiküllerin şekilsel karakteristikleri partiküllere zarar vermeden incelenebilmiştir. N12 formülasyonu için alınmış 2D eksenel görüntü ile oluşan partiküllerin daha çok kapsül yapısında oluşmuş olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.52). Bununla beraber ortamdaki kristal yapıdaki etken maddenin varlığı 3D görüntünün netleştirilmesini engellese de (Şekil 3.53), 2D eksenel görüntü içinden ROI değiştirilip seçilen tek partikül için düzgün 3D görüntü oluşturma işlemi gerçekleştirilebilmiştir (Şekil 3.54).

Oluşturulan görüntüler farklı ışık yansımaları veya renkler kullanılarak renklendirilebilmiş böylece daha net görüntüler elde edilebilmiştir (Şekil 3.56 ve Şekil 3.63). Formülasyonlar içerisinde oluşmuş olan poröz nanopartiküller de 2D eksenel görüntüler ile tespit edilebilmiş (Şekil 3.57, Şekil 3.59 ve Şekil 3.62), 3D görüntülerle de bu partiküllerin varlığı gösterilmiştir (Şekil 3.58 ve Şekil 3.60). Ayrıca partiküller boyutlarına göre renklendirilip seçilmiş olan ROI içerisindeki boyut dağılımı da renklere göre grafiklendirilebilmiştir (Şekil 3.61).

Nano-BT ile gerçekleştirilmiş görüntülemeler sonucunda nanopartiküller için seçilmiş bazı parametreler için analizler gerçekleştirilmiş ve Çizelge 3.23 ile gösterilmiş olan sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre elde edilen partiküllerin SMI değerleri 3'ün üzerinde bulunmuş (2,9 - 3,8) bu değerler yapının küresel olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.23) (Salmon ve ark., 2015). Ayrıca partiküllerin % poroziteleri hesaplanmış N18 formülasyonu en yüksek poroziteye sahip formülasyon olarak

bulunmuştur. Bu formülasyonun nano-BT görüntüleri de poröz yapıya sahip partiküllerin varlığını göstermiştir (Şekil 3.57 ve Şekil 3.58). Ayrıca *in vitro* çözünme hızı verileri de göz önüne alınarak değerlendirildiğinde poröz yapısının salımı etkilemiş olduğu da söylenebilir (84 günde % $57,12 \pm 15,44$) (Şekil 3.39). Nano-BT ile hesaplanmış olan ortalama partikül boyutu değerleri bizim kullandığımız partikül boyutu analiz yöntemi sonuçları ile benzerlik göstermemektedir. Bunun sebebinin de partiküllerin nano-BT ile analiz edilebilmesi için partiküllerin elektrostatik çekim kuvvetleri ile numune tutucusuna tutturulması ve bu yüzden de daha küçük partiküllerin yüksek yüzey enerjileri sebebi ile daha fazla tutunmuş olabileceği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

4.4. Nanopartikül-Film ve Nanopartikül-Greft Formülasyonlarının Özelliklerinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Nanopartikül-film kombinasyon formülasyonları alan hesabı üzerinden belirlenmiş olan doz üzerinden giderek her film kesitinde 1 mg klindamisin fosfat ve etkili minimum dozda (20 ng) BMP-7 olacak şekilde formülasyonlar hazırlanmıştır. Bunun için hazırlama yöntemi olarak film formülasyonu kurutulmadan önce, liyofilize edilmiş toz haldeki nanopartiküller jel içerisinde dağıtılmış daha sonra cam petri kaplarına dökülerek kurutulmuştur. Bu filmlerin SEM görüntüleri çekilmiş ve nanopartiküllerin film içerisinde homojen dağılmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.71).

Nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonlarında da nanopartikül formülasyonunun hazırlanış aşamasında son santrifüjden sonra ultrasaf su içerisinde disperse halde bulunan nanopartiküllere greft materyali ilave edilerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve partiküllerin greftin gözeneklerine yerleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra liyofilize edilerek nanopartiküllerin greftin gözeneklerinde sabitlenmesi sağlanmıştır. SEM ve mikro-BT görüntülemeleri ile de partiküllerin greft gözeneklerinin arasına yerleşmiş olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.69 ve Şekil 3.70).

Kombinasyon formülasyonlarının *in vitro* çözünme hızı deneylerini gerçekleştirmek için BMP-7 ile hazırlanmış formülasyonlar model etken madde olarak kullanılan BSA ile tekrar hazırlanmıştır (*In vivo* deneyler için BMP-7 içeren formülasyonlar, *in vitro* etken madde çözünme hızı deneyleri için de aynı formülasyonların BSA ile hazırlanmış formları kullanılmıştır).

Nanopartikül-film ve nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonlarına ait *in vitro* çözünme hızı grafikleri sırasıyla Şekil 3.64 ve Şekil 3.65 ile gösterilmiştir. NF1 (film+BSA yüklü nanopartikül) - NF2 (film+BSA ve klindamisin fosfat yüklü nanopartikül) ve NG1 (greft+BSA yüklü nanopartikül) - NG2 (greft+BSA ve klindamisin fosfat yüklü nanopartikül) formülasyonlarının kendi aralarında salım hızları kıyaslandığında (BSA çıkışı açısından) anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$). NG2 formülasyonunda iki etken maddenin de çözünme hızları kıyaslandığında ise BSA'nın üç ay süreyle düzgün bir salım sergilediği klindamisin fosfatın ise yine polimer degradesyonuna bağlı olarak yaklaşık iki aylık süre sonunda salımının hızlandığı gözlenmiştir (Şekil 3.66). NBSA3 nanopartikül formülasyonu kullanılmış kombinasyon formülasyonları birbirleri ile kıyaslandığında ise nanopartiküllerin film içerisinde dağıtılmasıyla salım hızında artış, greft içerisine yüklenmesiyle ise anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 3.67). NBSA4 formülasyonu kullanılmış olan formülasyonlar karşılaştırıldığında ise yine greftle hazırlanmış formülasyonda salım hızında anlamlı bir azalma meydana gelirken film içerisinde dağıtılmış nanopartiküllerdeki (NF2) salım hızı ile tek başına nanopartiküllerden (NBSA4) elde edilen salım hızında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 3.68).

BSA yüklü nanopartikül ve kombinasyon formülasyonlarının salım kinetikleri incelendiğinde (Çizelge 3.24) formülasyonun tipine göre bazı değişiklikler gözlenmiştir.

NBSA3 ve NBSA4 nanopartikül formülasyonlarından BSA'nın salım mekanizması için kinetik modellerin r^2 değerlerine bakıldığında en yüksek değerler Higuchi ve Peppas kinetiği için gözlenmiştir. Fakat RSS değerleri incelendiğinde en

düşük değere Hixson-Crowell modeli ile ulaşılmıştır. Yani naopartiküler formülasyonlardan etken madde çıkışı için en uygun kinetik model olan Hixson-Crowell kinetik modeline uyum sağlamış ve bu formülsayondan etken maddenin salımı yüzey alanındaki değişime bağlı olduğu kinetik değerlendirme ile de kanıtlanmıştır (NBSA3 (449,6 ± 192,3 nm); (NBSA4 (790,9 ± 24,84 nm)) (Baishya, 2017; Dash ve ark., 2010; Hixson ve Crowell, 1931).

NF1 ve NF2 nanopartikül-film kombinasyon formülasyonları için kinetik modeller incelendiğinde ise en yüksek r^2 değerleri yine Higuchi modeli ile elde edilmiştir. Korsmeyer-Peppas ve Hixson-Crowell kinetiğinde ise r^2 değerleri birbirine oldukça yakındır (0,756-0,796 aralığında). Fakat RSS değerleri incelendiğinde, düşük RSS değeri ile (0,119 ve 0,126) kinetik uyumun yine Hixson-Crowell kinetik modeline olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.24).

NG1 ve NG2 formülasyonları için de en yüksek r^2 değerleri Higuchi kinetiği ile elde edilmiş fakat en düşük RSS değeri Hixson-Crowell kinetiği ile elde edilmiş ve yine bu kinetiğe uyum gözlenmiştir (Çizelge 3.24).

4.4.1. Kombinasyon Formülasyonlarının *In vivo* Deney Bulgularının Değerlendirilmesi

In vivo deneyler sonucunda iki haftalık histopatoloji deney sonuçları ve iki ve dört haftalık mikro-BT analiz sonuçları kendi içerisinde ve birbirleri ile değerlendirilmiştir (Çizelge 3.25, Çizelge 3.26 ve Çizelge 3.27).

Histopatoloji çalışmaları yapılmadan önce % 10 formalinde bekletilmiş olan iki ve dört haftalık deney gruplarından alınmış dokuların mikro-BT analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz için öncelikle doku üzerinde yer alan defektli bölgenin yeri tüm eksenlerden bakılarak tespit edilmiştir (Şekil 3.72). Daha sonra uygulama bölgesi belirlenmiş (Şekil 3.73) ve bu bölge işaretlenmiştir (ROI) (Şekil 3.74). Gri seviye histogramı ile tüm görüntü eşiklendikten sonra (Şekil 3.75) defektli bölgede oluşan

yeni doku belirlenmiş (Şekil 3.76) ve hacim hesaplamaları (VOI) bu bölge için gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.25). Tüm mandibulanın ve oluşturulmuş defektli bölgenin 3D görüntüsü Şekil 3.77’de gösterilmiştir.

Hacim hesaplamaları sonucunda kontrol grubunda hem iki hem de dört haftalık süre sonunda en az kemik oluşumunun gözlenmesi tedavinin tüm formülasyon grupları için kontrol grubuna göre etkin bir şekilde gerçekleşebildiğini göstermiştir. İki haftalık sonuçlara göre sadece BMP-7 yüklü nanopartikül (N33) ve bu nanopartikül kullanılarak hazırlanmış olan kombine formülasyonlar (NF1 ve NG1) birbirine benzer bir etkinlik göstermiş ve yeni oluşan kemik hacminin 0,195 - 0,216 mm³ aralığında olduğu belirlenmiştir. BMP-7 ve klindamisin fosfatı birarada içeren nanopartiküller (N34) ve bu nanopartiküllerin kullanıldığı film (N34 için 0,497 mm³) ve greft (NG2 için 0,056 mm³) formülasyonları arasındaki fark oldukça fazla bulunmuştur (Çizelge 3.25). Bu farkın NG2 ile *in vitro* çözünme hızı grafiklerinde de gösterilmiş olduğu gibi salımın daha yavaş gerçekleşmesinden dolayı olmuş olabileceği düşünülmüştür (Şekil 3.68). Sadece BMP-7 içeren ve BMP-7 ve klindamisin fosfatı bir arada içeren nanopartikül ve film grupları kendi içlerinde değerlendirildiklerinde klindamisin fosfatın etkili şekilde tedaviyi desteklemiş olduğu gözlenmektedir. Ayrıca yine *in vitro* salım profillerine göre iki etken maddeyi birlikte içeren nanopartikül formülasyonunun proteinik maddeyi daha hızlı açığa çıkarması *in vivo* sonuçları destekler niteliktedir (Şekil 3.68 ve Çizelge 3.25).

Dört hafta sonunda ayrılmış olan kemik dokularının mikro-BT analiz sonuçlarına bakıldığında nanopartikül grubu ve greft grubu kendi içerisinde değerlendirildiğinde yine BMP-7 ve klindamisin fosfatı birlikte içeren gruplar (N34 ve NG2) tek başına BMP-7 içeren formülasyonlara göre daha etkin bir iyileşme gerçekleştirebilmiştir. Fakat film grubunun kendi içerisinde (NF1 ve NF2) dördüncü hafta sonundaki sonuçlarda bu kadar bariz bir fark izlenmemiştir (Sırasıyla 0,841 mm³ ve 0,837 mm³). Gruplar birbirleri ile kıyaslandığında ise film grubunun her iki alt grubu da belirgin şekilde en iyi iyileşmeyi göstermiştir. İkinci haftada daha etkisiz görünen greft grubunda kemik hacmi miktarı 4. hafta sonunda artmış, hatta sadece BMP-7 içeren nanopartikül (N33) ve bu nanopartiküller kullanılarak hazırlanmış NG1

formülasyonu kıyaslandığında NG1'in daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bunun da sebebinin oluşan kemik dokusunu sentetik greft materyalinin desteklemesi olduğu düşünülebilir. Fakat bu sonuç klindamisin fosfatı da içeren partiküller N34 ve bu partiküllerle hazırlanmış NG2 formülasyonları için söylemek pek mümkün değildir. N34 için hesaplanan VOI değeri $0,829 \text{ mm}^3$ iken greft içine yerleştirilme sonunda $0,578 \text{ mm}^3$ olarak bulunmuştur. Burada da proteinik maddenin N34 formülasyonundan çıkış hızının NG2'ye göre daha fazla olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Şekil 3.68).

Çalışmada iki haftalık uygulama sürecinin sonunda, histopatolojik analizler değerlendirildiğinde nanopartikül uygulanmış denek gruplarında yalnız BMP-7 içeren nanopartiküllerin (N33) uygulandığı hayvanlarda osteosit ve osteoblastik artışların önemli ölçüde olduğu görülmekle birlikte kemik çatının oluşumunda kondrositlerin fokal artışları ve osseöz niş yapılarının da şekillendiği görülmüştür. BMP-7 ve klindamisin fosfatı bir arada içeren nanopartikül (N34) formülasyonunun uygulandığı grupta ise belirgin şekilde osteoblastik aktivite ve kapillarizasyon gözlenmiş, defektli bölge çevresindeki bölgede bağ dokunun kendine ait hücreleri dışında herhangi bir fibrosit-fibroblast artışı gözlenmemiştir. Uygulamanın yapılmış olduğu yerin hemen çevresindeki gevşek dokuya ait bölgede de kanama ve yangısal değişikliklerin sona ermiş olduğu belirlenmiştir.

Film grubu uygulanmış denekler içerisinde, yalnız BMP-7 yüklü nanopartiküllerle hazırlanmış olan film (NF1) uygulaması yapılanlarda, aynı nanopartikül grubundaki gibi yalnız BMP-7 içeren nanopartikül (N33) uygulamasına benzer şiddette bir osteosit-osteoblast proliferasyonu görülürken, osseöz niş ve kondromatöz oluşumların yine fokal ancak daha az sayıda geliştiği izlenmiştir. Klindamisin fosfat ve BMP-7'yi birarada içeren nanopartiküllerle hazırlanmış olan NF2 formülasyonu ile ise NF1'e göre daha fazla osteoblastik ve osseöz niş oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 3.27). Bununla birlikte film formülasyonlarının her iki grubunun uygulandığı deneklerde de (NF1 ve NF2) kapillarizasyonun nanopartikül grubuna göre daha az olduğu görülmüştür. Diğer taraftan defekt bölgesindeki dejeneratif-nekrotik değişikliklerin dar bir alanda da olsa bulunduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla, film

gruplarında nanopartikül uygulaması yapılan alt gruplara göre defektli bölgedeki rejeneratif kapasitenin düşük olduğu ve geçen birim zaman içerisinde beklenen düzeyde etkin bir iyileşme olmadığını göstermiştir.

Greftle hazırlanmış formülasyonların uygulanmış olduğu deney grupları içerisinde yalnız BMP-7 içeren nanopartiküllerin yüklendiği NG1 ve her iki etken maddeyi de içeren NG2 formülasyonlarının uygulandığı gruplar kendi içlerinde kıyaslandıklarında aralarında histopatolojik olarak herhangi bir fark bulunmamıştır.

Greft ve film içerisinde yalnız BMP-7'yi içeren nanopartikülün bulunduğu formülasyonların (sırasıyla NG1 ve NF1) uygulanması sonucunda birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle film ve greft gruplarının hem klindamisin fosfat hem de BMP-7'yi beraber içeren nanopartiküllerin yüklü olduğu gruplarda (NF2 ve NG2) temel histopatolojik görüntünün birbirlerine paralellik gösterdiği anlaşılmıştır. Fakat greft grubundakilerde, nanopartikül ve film gruplarındaki deneklerden farklı olarak kondromatöz oluşumların şekillenmediği görülmüştür. Dolayısıyla, bu grupta yapılan uygulamaların da defektli bölgenin eski yapısına kavuşmasında, film uygulaması yapılanlar kadar etkili olmadığı anlaşılmıştır. Bununla beraber hem greft hem de film grubu ile N34'ün uygulanmış olduğu doku kadar etkin bir rejeneratif kapasite sağlayamadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Kontrol grubundaki deneklerde de osteoblastik proliferasyonlar ve kapillarizasyon diğer deney gruplarına göre hafif düzeyde de olsa mevcut bulunmuştur. Ancak diğer gruplardan farklı olarak az sayıda nötrofil lökosit, lenfosit, plazma hücresi ve makrofajların bir arada bulunduğu hafif yangısal değişiklikler dikkat çekmiştir. Bu bulguya formülasyon gruplarının uygulanmış olduğu defektli bölgelere göre daha belirgin gelişmiş dejeneratif-nekrotik değişiklikler eşlik etmiştir. Deney grupları içerisinde film ve greft gruplarının uygulandığı dokularda dejeneratif ve nekrotik değişikliklerin nanopartikül grubuna göre belirgin derecede fazla ancak kontrol grubuna göre az olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında, nanopartikül, film ve greft gruplarının, kontrol grubuna göre daha anlamlı şekilde osteosit ve osteoblastik proliferasyonu arttırdığı, defekt bölgesi ve çevresindeki kemik dokuyu daha etkili şekilde olgunlaştırdığı ve dejeneratif değişiklikleri azalttığı görülmüştür. Kontrol grubunda iki haftalık süreç içerisinde kanamanın ve yangı hücrelerinin varlığı rejenerasyonun kendi haline bırakıldığında yavaş geliştiğini göstermiştir. Yine formülasyon gruplarının uygulanmasıyla sınırlı da olsa gelişen kondromatöz alanların yerini kontrol grubunda hafif fibröz proliferasyonların aldığı fark edilmiştir. Bu da yine defekt bölgesi ve çevresindeki kemikleşmenin iki haftalık süreçte daha yavaş şekillendiği izlenimi vermiştir. Ayrıca kapillar damarların gelişmemesi ve kondrositlerin rastlandığı alanların daha az olması da yine kontrol grubunda iyileşmenin yavaş ilerlediğini göstermiştir.

Genel anlamda tüm gruplarda BMP-7 ile birlikte tercih edilen klindamisin fosfatın yangısal değişiklikleri başarıyla önlediği görülmüştür. Sadece nanopartikül uygulanan gruplarda, dokunun iyi beslendiği ve osseöz nişlerin çabuk geliştiği, ossifikasyona daha hızlı ulaşıldığı gözlenmiştir. Defekt uygulaması yapılan bölgede herhangi bir dejenerasyon veya nekroza ilişkin rezidüel dokunun olmaması da bu kemik çatının uyumlu geliştiği izlenimini vermiştir.

Film ve greft formülasyonlarının uygulandığı gruplar ise kendi arasında karşılaştırıldığında her iki grupta da yalnız BMP-7 yüklenmiş nanopartikül içerenler (NF1 ve NG1) arasında anlamlı bir farklılık izlenmemesine rağmen, BMP-7 ve klindamisin fosfat yüklü nanopartikül içerenlerde (NF2 ve NG2) osteoblastik artışlar, osseöz niş ile kemik dokunun şekillenmesi ve kondromatöz alanlar arasında farklılık bulunmuştur (Çizelge 3.27). Bu bulgular film uygulamasında daha belirgin olarak gözlenmiştir. Dolayısıyla film formülasyonunda NF2'nin NG2'ye göre aynı sürede rejenerasyonda daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Nanopartiküller karşılaştırıldığında ise, yalnız BMP-7 içeren nanopartiküller (N33) NF1 ve NG1 ile benzer sonuçlar taşısa da, kemik yapının daha geniş alanları kapsamaları ve kapillarizasyonun daha iyi olması N33'ün uygulandığı bölgede rejenerasyonun daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte nanopartikül grubundaki BMP-7 ile

BMP-7 ve klindamisin fosfatı birlikte içeren formülasyonların uygulanmış olduğu dokular kendi arasında ve diğer gruplarla kıyaslandığında kemik rejenerasyonunu iki haftalık süre içerisinde defektsiz, inflamasyonsuz şekilde daha fazla hızlandırdığı görülmüştür. Tüm bu sonuçlar kıyaslandığında nanopartikül şeklinde uygulamaların özellikle kemik dokunun şekillenmesine önemli katkılar sağladığı, BMP-7 ile birlikte bir antibiyotiğin (klindamisin fosfat) kullanılmasının daha başarılı olduğu ve kemik dokudaki defektleri kapatmada da daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak film uygulamasının, nanopartikül uygulaması kadar olmasa da greft uygulamasına göre daha anlamlı bir başarı getirdiği de yadsınmaz bir sonuç olarak görülmüştür.

Sonuç olarak hem mikro-BT hem de histopatoloji analiz yöntemi birbirleri ile iki haftalık sonuçlar üzerinden karşılaştırma yapıldığında formülasyon grupları ile kontrol grubu arasında bu kısa süre içinde bile anlamlı değişikliklerin meydana geldiği kanıtlanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemik rejenerasyonu tedavisinde kullanılmak üzere klindamisin fosfat ve BMP-7 içeren hazırlanan nanopartikül, film, nanopartikül-film ve nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonlarının hazırlanması ve değerlendirilmesi ile ilgili bu tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir;

1. Polielektrolit kompleks film oluşturmak için polimerlerin derişimleri ve miktarları değiştirilerek birçok deneme gerçekleştirilmiş ve *in vitro* incelemeler sonucunda uygulama, etken madde salımı, adezyon, kalınlık ve işlem etkinliği gibi özellikler açısından en uygun formülasyon 15 mL % 3 aljinat çözeltisi ve 5 mL % 1 düşük molekül ağırlıklı kitozan çözeltisi kullanıldığında (AC33) elde edilmiştir.
2. Klindamisin fosfat yüklü aljinat ve kitozan filmlerle salım süresi bir saatten sekiz saate kadar uzatılabilmiş aljinat-kitozan polielektrolit kompleks filmlerle etken madde film içerisinde oluşan mikron boyutundaki kapsüllere hapsediği için salım süresi 12 saate çıkarılabilmektedir.
3. Film formülasyonları mikro-BT ile üç boyutlu olarak detaylı şekilde taranabilmiş, kompleks filmlerde koaservatlar görüntülenebilmiştir. Bu çalışma ile literatürde ilk defa filmin yapısal incelemesinde mikro-BT kullanılmış, bu analiz sayesinde filmin içerisinde oluşan gözenek, kompleks yapı gibi farklı dokuların kantitatif analizleri de yapılabilmek, yapı içinde por çapı ve hacmi de aynı analiz ile elde edilebilmiştir.
4. Tez çalışması kapsamında hazırlanan film formülasyonlarının hem periodontal uygulamalarda hem de dental cerrahi operasyonlarda tedavi amaçlı kullanılabilecek bir ilaç şekli olabileceği *in vitro* ve *in vivo* sonuçlarla kanıtlanabilmiştir.
5. Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için kullanılan polimerler arasından etken madde yükleme etkinliği ve planlanan salım süresinin sağlanabilmesinde çalışmamızda kullanılan polimerlerden en uygun olanının 24-38 kDa molekül ağırlığında 50:50 laktik asit-glikolik asitten oluşan ester uçlu PLGA olduğu sonucuna varılmıştır.

6. Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında dış fazın PVA derişimi % 0,3 ve pH'sı pH 10 iken en yüksek % işlem etkinliği ve hedeflenen en düzgün salım profiline sahip nanopartiküller hazırlanmıştır.
7. Nanopartiküllerin görüntülenmesinde mikro-BT'nin çözünürlüğünün yeterli olmaması sebebi ile görüntüleme yapılamamış, nano-BT ile üç boyutlu olarak anlaşılabilir görüntüler elde edilebilmiş, kantitatif analizler gerçekleştirilebilmiştir. Üç boyutlu analizler sayesinde yapısal durum daha net anlaşılabilmiş ve etken madde yükleme kapasitesi ve etken madde salım hızında yapıda oluşan kapsül kılıf kalınlığı, gözenekliliğın kantitatif tayini gibi sonuçlar ile sadece SEM görüntüleri ile elde edilemeyecek çeşitli tartışmalar yapılabilmış ve hedefe uygun formülasyonlar daha rahat seçilebilmiştir.
8. Nanopartikül-film kombinasyon formülasyonlarında nanopartiküllerin film içerisinde homojen dağıtılabildiği ve nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonlarında nanopartiküllerin grefte hapsedilebildiği SEM ve mikro-BT görüntüleme yöntemleri ile kanıtlanmıştır.
9. Nanopartikül-film kombinasyon formülasyonunda nanopartiküle yüklenmiş etken maddenin salım profilinde anlamlı bir değişim gözlenmemişken nanopartikül-greft formülasyonlarının salım hızında yavaşlama tespit edilmiştir bu da film materyallerinin uygulama bölgesinde greft materyaline göre daha çözünür olması nedeniyle nanopartiküllerin daha kolay serbest hale geçişi ile açıklanabilmektedir.
10. Çalışmamızda *in vivo* uygulamanın kolaylığı düşünülerek film formülasyonları hazırlanmıştır. Filmlerle uygulama kolaylığı olmasına rağmen nanopartiküllerin de uygulama bölgesine kolayca doze edilebildiği gözlenmiştir.
11. Tez çalışmasında antimikrobiyal bir etken maddenin BMP-7 ile birlikte kombine formülasyonlarının hazırlanmasında tedavi için çok önemli bir avantaj sağlanmış ve diş hekimlerinin uygulamaları sırasında farklı iki etken maddeyi aynı anda tek bir ilaç şekli ile uygulama kolaylığı gerçekleştirilebilmiştir.
12. Yapılan histopatolojik incelemeler, mikro-BT ile elde edilen sonuçlar ile tutarlı bulunmuş ve tez kapsamında geliştirilen ilaç şekilleri ile kontrol grubuna göre belirgin şekilde kemikleşmenin 2 hafta da bile elde edilebildiği tespit edilmiştir. Bu da diş hekimlerinin periodontal tedavilerde ve dental cerrahi operasyonlarda kullanabileceği birden fazla ilaç şeklinin geliştirilebildiğini göstermektedir.

13. Çalışmada elde edilen formülasyonların patent başvurusunun yapılabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ışığında, *in vivo* deneyler rejenerasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılabilmesi için ön çalışma olarak iki hafta ve bir ay süreyle gerçekleştirilmiştir. Fakat tam anlamıyla kemiğin rejenere olduğunun gözlenmesi için *in vivo* değerlendirmelerin ikinci ay için de yapılması önerilmektedir.



ÖZET

Dental cerrahi işlemler sonrasında kemik rejenerasyonunda kullanılmak üzere büyüme faktörü ve antibiyotik yüklü nanopartikül, film ve greft materyali kombinasyonlarının hazırlanması ve değerlendirilmesi

Bu çalışmada, dental kemik rejenerasyonunda kullanılmak üzere kemik morfogenetik protein ve klindamisin fosfat yüklü polimerik nanopartikül ve bu nanopartiküllerin yüklendiği film veya greftle elde edilen formülasyonların hazırlanması ve *in vitro* - *in vivo* değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Dişlerin etrafını saran kemik doku travmatik, patolojik veya fizyolojik sebepler ile kaybedilebilmekte ve bu durum diş kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle dental cerrahi alanındaki çalışmalar, dişlerin etrafındaki kemik kaybını engellemek ve kemik rejenerasyonu üzerine yoğunlaşmıştır.

Son yıllarda, kemik rejenerasyonunda önemli rolleri olan büyüme faktörleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmış ancak, kısa yarı ömürleri, uygulama zorlukları ve ancak yüksek doz faktör varlığında biyoaktivitesinin sağlanabilmesi gibi nedenlerle kullanımları sınırlı kalmıştır. Bunun yanında, rejeneratif tedaviler sonrası iyileşmenin aksamaması ve ideal rejenerasyon elde edilebilmesi için büyüme faktörleri ile birlikte tedavilerde antimikrobiyallerin kullanımı ile konak cevabının modüle edilmesi önerilmektedir. Tedavideki bu gereksinimlerden dolayı, kemik morfogenetik protein ve klindamisin fosfatı aynı ilaç şeklinde içeren formülasyonların hazırlanması ile rejenerasyon derecesinin artırılabilceği düşünülmüştür.

Çalışma kapsamında öncelikle planlanan polielektrolit kompleks (PEC) filmleri oluşturabilmek için aljinat ve kitozan ile ayrı ayrı film denemeleri yapılmıştır. Bu ön denemelerin ışığında film dökme yöntemi ile klindamisin fosfat yüklü PEC filmler oluşturulmuştur. Klindamisin fosfatı ve büyüme faktörünü ayrı ayrı veya bir arada içeren nanopartiküller ise emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Ardından ideal formülasyonlar seçilmiş ve nanopartikül-film ve nanopartikül-greft kombinasyon formülasyonları hazırlanmıştır. Filmlerin özelliklerinin incelenmesi için DSC analizi, viskozluk, kalınlık ve ağırlık ölçümleri, işlem etkinliği, *in vitro* çözünme hızı deneyi, adezyon testleri, FTIR analizi, SEM ve mikro-BT analizleri; nanopartiküllerin özelliklerinin incelenmesi için zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve partikül büyüklük dağılımı incelemeleri, işlem etkinliği, *in vitro* çözünme hızı deneyi, SEM ve mikro- ve nano-BT analizleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra seçilen formülasyonlar kemik dejenerasyonu oluşturulmuş dişi Wistar albino ratlara uygulanmış ve gerçekleşen rejenerasyon histopatolojik ve mikro-BT incelemeleri ile değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak iki etken maddeyi ayrı ayrı ve birlikte içeren ideal formülasyonlar hazırlanmış, *in vivo* uygulamalar sonucunda da oluşturulmuş formülasyonların kemik rejenerasyonunda etkili olduğu ve kombine ilaç tedavisinin tek bir ilaç taşıyıcı sistemde verilmesinin en etkin tedavi şekli olduğu bulunmuştur. İlerleyen yıllarda periodontal ve dental tedavide kullanılması ve patentlenebilmesi mümkün olan formülasyonlar geliştirilebilmiştir.

Anahtar sözcükler: Greft, Kemik morfogenetik protein, Klindamisin fosfat, Nanopartikül, Polielektrolit kompleks film

SUMMARY

The preparation and evaluation of the combination of growth factor and antibiotic drug loaded nanoparticles, film and graft material to be used for bone regeneration after dental surgical procedures

In this study, it is aimed to prepare and *in vitro-in vivo* evaluation of bone morphogenetic protein and clindamycin phosphate loaded polymeric nanoparticles and film or graft formulations loaded with these nanoparticles for use in dental bone regeneration.

Bone tissue surrounding the teeth may be lost due to traumatic, pathological or physiological reasons, which may result in tooth loss. Therefore, studies in the field of dental surgery have focused on preventing bone loss around the teeth and bone regeneration.

Over recent years, studies have focused on growth factors that have important roles in bone regeneration, but their use has been limited due to their short half-life, application difficulties, and the ability to achieve bioactivity only in the presence of high-dose factor. In addition, it is suggested to modulate the host response by using antimicrobials in the treatment of growth factors together with regeneration treatments in order to prevent recovery and to achieve ideal regeneration. Due to these requirements in treatment, it is thought that the degree of regeneration can be increased by preparing formulations containing growth factor and clindamycin phosphate together.

In the scope of the study, alginate and chitosan film preparation experiments were performed separately in order to form the planned polyelectrolyte complex (PEC) films. In the light of these preliminary experiments, clindamycin phosphate loaded PEC films were prepared by film casting method. Nanoparticles containing clindamycin phosphate and growth factor separately or together were prepared by emulsifying and solvent evaporation technique. Then the ideal formulations were selected and nanoparticle-film and nanoparticle-graft combination formulations were prepared. For film characterization DSC analysis, viscosity, thickness and weight measurements, drug content, *in vitro* drug release studies, *in vitro* adhesion tests, FTIR analysis, SEM and micro-CT analysis; and for the characterization of nanoparticles, zeta potential, particle size and particle size distribution investigations, drug loading, *in vitro* drug release studies, SEM and micro- and nano-CT analyzes were performed. Then the selected formulations were applied to female Wistar albino rats with bone degeneration and the regeneration was evaluated by histopathological and micro-CT examinations.

As a result, ideal formulations containing two active substances separately or together were prepared and it was found that the formulations as a result of *in vivo* applications were effective in bone regeneration and it was found that the combined drug treatment in a single drug delivery system was the most effective treatment. Formulations that can be used and patented in periodontal and dental treatment have been developed in the following years.

Keywords: Bone morphogenetic protein, Clindamycin phosphate, Graft, Nanoparticle, Polyelectrolyte complex film

KAYNAKLAR

- AHMED MG, RAIKAR P, NAIK S (2019). Formulation and evaluation of chitosan films containing sparfloxacin for the treatment of periodontitis. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **9(1)**: 38-45.
- AKTAS Y, ANDRIEUX K, ALONSO MJ, CALVO P, GURSOY RN, COUVREUR P, CAPAN Y (2005a). Preparation and *in vitro* evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. *Int J Pharm*, **298(2)**: 378-383.
- AKTAS Y, YEMISCI M, ANDRIEUX K, GURSOY RN, ALONSO MJ, FERNANDEZ-MEGIA E, NOVOA-CARBALLAL R, QUINOA E, RIGUERA R, SARGON MF, CELIK HH, DEMIR AS, HINCAL AA, DALKARA T, CAPAN Y, COUVREUR P (2005b). Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjugate Chem*, **16(6)**: 1503-1511.
- ALENEZI A, NAITO Y, TERUKINA T, PRANANINGRUM W, JINNO Y, TAGAMI T, OZEKI T, GALLI S, JIMBO R (2018). Controlled release of clarithromycin from PLGA microspheres enhances bone regeneration in rabbit calvaria defects. *J Biomed Mater Res B*, **106(1)**: 201-208.
- ALGUL D, SIPAHI H, AYDIN A, KELLECI F, OZDATLI S, YENER FG (2015). Biocompatibility of biomimetic multilayered alginate-chitosan/beta-TCP scaffold for osteochondral tissue. *Int J Biol Macromol*, **79**: 363-369.
- ALICI-GARIPCAN A, KORKUSUZ P, BILGIC E, ASKIN K, AYDIN HM, OZTURK E, INCI I, OZKIZILCIK A, KAMILE OZTURK K, PISKIN E, VARGEL I (2019). Critical-size alveolar defect treatment via TGF-ss3 and BMP-2 releasing hybrid constructs. *J Biomater Sci Polym Ed*, **30(5)**: 415-436.
- ALSHARABASY AM, MOGHANNEM SA, EL-MAZNY WN (2016). Physical preparation of alginate/chitosan polyelectrolyte complexes for biomedical applications. *J Biomater Appl*, **30(7)**: 1071-1079.
- ANDREWS GP, LAVERTY TP, JONES DS (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, **71(3)**: 505-518.
- ARZATE-VAZQUEZ I, CHANONA-PEREZ JJ, CALDERON-DOMINGUEZ G, TERRES-ROJAS E, GARIBAY-FEBLES V, MARTINEZ-RIVAS A, GUTIERREZ-LOPEZ GF (2012). Microstructural characterization of chitosan and alginate films by microscopy techniques and texture image analysis. *Carbohydrate Polymers*, **87(1)**: 289-299.
- BABO PS, PIRES RL, REIS RL, GOMES ME (2014). Membranes for periodontal tissues regeneration. *Ciência & Tecnologia dos Materiais*, **26(2)**: 108-117.

- BAISHYA H (2017). Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. *Journal of Developing Drugs*, **06(02)**: 1-8.
- BANERJEE A, GANGULY S (2019). Alginate-chitosan composite hydrogel film with macrovoids in the inner layer for biomedical applications. *J Appl Polym Sci*, **136(22)**: 1-9.
- BAO Y, ZHANG H, LUAN Q, ZHENG M, TANG H, HUANG F (2018). Fabrication of cellulose nanowhiskers reinforced chitosan-xylan nanocomposite films with antibacterial and antioxidant activities. *Carbohydr Polym*, **184**: 66-73.
- BARATI D, SHARIATI SRP, MOEINZADEH S, MELERO-MARTIN JM, KHADEMHOSEINI A, JABBARI E (2016). Spatiotemporal release of BMP-2 and VEGF enhances osteogenic and vasculogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and endothelial colony-forming cells co-encapsulated in a patterned hydrogel. *J Control Release*, **223**: 126-136.
- BATZIAS GC, DELIS GA, KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU M (2004). A new HPLC/UV method for the determination of clindamycin in dog blood serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35(3)**: 545-554.
- BETTINI R, ROMANI AA, MORGANTI MM, BORGHETTI AF (2008). Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *Eur J Pharm Biopharm*, **68(1)**: 74-81.
- BHATTARAI N, GUNN J, ZHANG M (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **62(1)**: 83-99.
- BIERHALZ ACK, MORAES AM (2017). Composite membranes of alginate and chitosan reinforced with cotton or linen fibers incorporating epidermal growth factor. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **76**: 287-294.
- BILENSOY E. (2014). Nanopartiküller. In: *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları* Ed.: Zırh-Gürsoy, A., İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği. Vol. 3, 23-39.
- BLACKWOOD KA, BOCK N, DARGAVILLE TR, ANN WOODRUFF M (2012). Scaffolds for Growth Factor Delivery as Applied to Bone Tissue Engineering. *International Journal of Polymer Science*, **2012**: 1-25.
- BOUXSEIN ML, BOYD SK, CHRISTIANSEN BA, GULDBERG RE, JEPSEN KJ, MULLER R (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*, **25(7)**: 1468-1486.
- BOZKIR A, DEVRIM B (2014). Preparation and characterization of protein-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles with polycaprolactone as polymeric core material. *Journal of Biomolecular Research & Therapeutics*, **03(03)**: 1-4.
- BRITANNICA E. (2019). Encyclopædia Britannica.
- BROOK I, LEWIS MA, SÁNDOR GK, JEFFCOAT M, SAMARANAYAKE L, ROJAS JV (2005). Clindamycin in dentistry: More than just effective prophylaxis for

endocarditis? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **100(5)**: 550-558.

CAFFERATA EA, ALVAREZ C, DIAZ KT, MAUREIRA M, MONASTERIO G, GONZALEZ FE, COVARRUBIAS C, VERNAL R (2018). Multifunctional nanocarriers for the treatment of periodontitis: Immunomodulatory, antimicrobial, and regenerative strategies. *Oral Dis*, **1-13**.

CARVALHO SM, OLIVEIRA AAR, LEMOS EMF, PEREIRA MM (2013). Bioactive glass nanoparticles for periodontal regeneration and applications in dentistry. *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*: 299-322.

CHEOW WS, HADINOTO K (2010). Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods. *Colloid Surface A*, **370(1-3)**: 79-86.

CHITKARA D, KUMAR N (2013). BSA-PLGA-based core-shell nanoparticles as carrier system for water-soluble drugs. *Pharm Res*, **30(9)**: 2396-2409.

CHOTITUMNAVEE J, PARAKAW T, SRISATJALUK RL, PRUKSANIYOM C, PISITPIPATTANA S, THANATHIPANONT C, AMARASINGH T, TIANKHUM N, CHIMCHAWEE N, RUANGSAWASDI N (2019). In vitro evaluation of local antibiotic delivery via fibrin hydrogel. *J Dent Sci*, **14(1)**: 7-14.

COLZANI B, SPERANZA G, DORATI R, CONTI B, MODENA T, BRUNI G, ZAGATO E, VERMEULEN L, DAKWAR GR, BRAECKMANS K, GENTA I (2016). Design of smart GE11-PLGA/PEG-PLGA blend nanoparticulate platforms for parenteral administration of hydrophilic macromolecular drugs: synthesis, preparation and in vitro/ex vivo characterization. *Int J Pharm*, **511(2)**: 1112-1123.

CONZATTI G, FAUCON D, CASTEL M, AYADI F, CAVALIE S, TOURRETTE A (2017). Alginate/chitosan polyelectrolyte complexes: A comparative study of the influence of the drying step on physicochemical properties. *Carbohydr Polym*, **172**: 142-151.

COSTA P, SOUSA LOBO JM (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, **13(2)**: 123-133.

CROSSINGHAM YJ, KERR PG, KENNEDY RA (2014). Comparison of selected physico-chemical properties of calcium alginate films prepared by two different methods. *Int J Pharm*, **473(1-2)**: 259-269.

DALPIAZ A, SACCHETTI F, BALDISSEROTTO A, PAVAN B, MARETTI E, IANNUCELLI V, LEO E (2016). Application of the "in-oil nanoprecipitation" method in the encapsulation of hydrophilic drugs in PLGA nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **32**: 283-290.

DASH S, MURTHY PN, NATH L, CHOWDHURY P (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, **67(3)**: 217-223.

- DAVYDOVA VN, KALITNIK AA, MARKOV PA, VOLOD'KO AV, POPOV SV, ERMAK IM (2016). Cytokine-inducing and anti-inflammatory activity of chitosan and its low-molecular derivative. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **52(5)**: 476-482.
- DE WITTE TM, FRATILA-APACHITEI LE, ZADPOOR AA, PEPPAS NA (2018). Bone tissue engineering via growth factor delivery: From scaffolds to complex matrices. *Regen Biomater*, **5(4)**: 197-211.
- DEL CASTILLO-SANTAELLA T, ORTEGA-OLLER I, PADIAL-MOLINA M, O'VALLE F, GALINDO-MORENO P, JODAR-REYES AB, PEULA-GARCIA JM (2019). Formulation, colloidal characterization, and in vitro biological effect of BMP-2 loaded PLGA nanoparticles for bone regeneration. *Pharmaceutics*, **11(8)**: 1-18.
- DEMIR YK, METIN AU, SATIROGLU B, SOLMAZ ME, KAYSER V, MADER K (2017). Poly (methyl vinyl ether-co-maleic acid) - Pectin based hydrogel-forming systems: Gel, film, and microneedles. *Eur J Pharm Biopharm*, **117**: 182-194.
- DEVIRIM B, BOZKIR A (2013). Preparation and evaluation of double-walled microparticles prepared with a modified water-in-oil-in-oil-in-water (w1/o/o/w3) method. *J Microencapsul*, **30(8)**: 741-754.
- DEVIRIM B, BOZKIR A (2014). Preparation and in vitro evaluation of surface-modified poly (lactide-co-glycolide) microparticles as biodegradable drug carriers for pulmonary peptide and protein delivery. *J Microencapsul*, **31(4)**: 355-362.
- DEVIRIM B, BOZKIR A. (2017). Nanocarriers and their potential application as antimicrobial drug delivery. In: *Nanostructures for Antimicrobial Therapy* Ed.: Fikai, A. 169-202.
- DIMITRIOU R, JONES E, MCGONAGLE D, GIANNOUDIS PV (2011). Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Med*, **9(66)**: 1-10.
- DING D, ZHU Q (2018). Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Materials Science and Engineering: C*, **92**: 1041-1060.
- DOLCI LS, LIGUORI A, PANZAVOLTA S, MISEROCCHI A, PASSERINI N, GHERARDI M, COLOMBO V, BIGI A, ALBERTINI B (2018). Non-equilibrium atmospheric pressure plasma as innovative method to crosslink and enhance mucoadhesion of econazole-loaded gelatin films for buccal drug delivery. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **163**: 73-82.
- DOOSTMOHAMMADI A, MONSHI A, SALEHI R, FATHI MH, GOLNIYA Z, DANIELS AU (2011). Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. *Ceram Int*, **37(7)**: 2311-2316.
- DWIVEDI C, PANDEY I, PANDEY H, PATIL S, MISHRA SB, PANDEY AC, ZAMBONI P, RAMTEKE PW, SINGH AV (2018). In vivo diabetic wound

- healing with nanofibrous scaffolds modified with gentamicin and recombinant human epidermal growth factor. *J Biomed Mater Res A*, **106(3)**: 641-651.
- EGGERT FM, DREWELL L, BIGELOW JA, SPECK JE, GOLDNER M (1991). The pH of gingival crevices and periodontal pockets in children, teenagers and adults. *Arch Oral Biol*, **36(3)**: 233-238.
- ELGALI I, OMAR O, DAHLIN C, THOMSEN P (2017). Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci*, **125(5)**: 315-337.
- EP9.0. (2017). European Pharmacopoeia.
- ESIM O, KURBANOGLU S, SAVASER A, OZKAN SA, OZKAN Y. (2019). Nanomaterials for Drug Delivery Systems. In: *New Developments in Nanosensors for Pharmaceutical Analysis* Ed.: Ozkan, S. A. Shah, A. 273-301.
- ESTEBAN-TEJEDA L, ZHENG K, PRADO C, CABAL B, TORRECILLAS R, BOCCACCINI AR, MOYA JS (2016). Bone tissue scaffolds based on antimicrobial SiO₂-Na₂O-Al₂O₃-CaO-B₂O₃ glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **432**: 73-80.
- FAROKHI M, MOTTAGHITALAB F, SHOKRGOZAR MA, OU KL, MAO C, HOSSEINKHANI H (2016). Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering. *J Control Release*, **225**: 152-169.
- FATTAHI A, KARIMI-SABET J, KESHAVARZ A, GOLZARY A, RAFIEE-TEHRANI M, DORKOOSH FA (2016). Preparation and characterization of simvastatin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution (RESS) with trifluoromethane. *J Supercrit Fluid*, **107**: 469-478.
- FELDKAMP LA, GOLDSTEIN SA, PARFITT AM, JESION G, KLEEREKOPER M (1989). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*, **4(1)**: 3-11.
- GAN D, LIU M, XU T, WANG K, TAN H, LU X (2018). Chitosan/biphasic calcium phosphate scaffolds functionalized with BMP-2-encapsulated nanoparticles and RGD for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*, **106(10)**: 2613-2624.
- GAO W, CHEN Y, ZHANG Y, ZHANG Q, ZHANG L (2018). Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **127**: 46-57.
- GHAFFARI A, MANAFI A, MOGHIMI HR (2015). Clindamycin phosphate absorption from nanoliposomal formulations through third-degree burn eschar. *World J Plast Surg*, **4(2)**: 145-152.
- GIBBS DM, BLACK CR, HULSART-BILLSTROM G, SHI P, SCARPA E, OREFFO RO, DAWSON JI (2016). Bone induction at physiological doses of BMP through localization by clay nanoparticle gels. *Biomaterials*, **99**: 16-23.
- GIERSZEWSKA M, OSTROWSKA-CZUBENKO J, CHRZANOWSKA E (2018). pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate. *European Polymer Journal*, **101**: 282-290.

- GILMORE KA, LAMPLEY MW, BOYER C, HARTH E (2016). Matrices for combined delivery of proteins and synthetic molecules. *Adv Drug Deliv Rev*, **98**: 77-85.
- GIRONDI NG, BARRETO F, PIGATTO MC, DALLA COSTA T (2018). Sensitive analytical method to quantify clindamycin in plasma and microdialysate samples: Application in a preclinical pharmacokinetic study. *J Pharmaceut Biomed*, **153**: 57-62.
- GONZALEZ G, SAGARZAZU A, CORDOVA A, GOMES ME, SALAS J, CONTRERAS L, NORIS-SUAREZ K, LASCANO L (2018). Comparative study of two silica mesoporous materials (SBA-16 and SBA-15) modified with a hydroxyapatite layer for clindamycin controlled delivery. *Micropor Mesopor Mat*, **256**: 251-265.
- GU W, WU C, CHEN J, XIAO Y (2013). Nanotechnology in the targeted drug delivery for bone diseases and bone regeneration. *Int J Nanomedicine*, **8**: 2305-2317.
- GULDBERG RE, BALLOCK RT, BOYAN BD, DUVALL CL, LIN AS, NAGARAJA S, OEST M, PHILLIPS J, PORTER BD, ROBERTSON G, TAYLOR WR (2003). Analyzing bone, blood vessels, and biomaterials with microcomputed tomography. *IEEE Eng Med Biol Mag*, **22(5)**: 77-83.
- HASSANI BESHILI N, DAMOOGH S, ZAFAR B, MOTTAGHITALAB F, MOTASADIZADEH H, REZAEI F, SHOKRGOZAR MA, FAROKHI M (2018). Preparation of a codelivery system based on vancomycin/silk scaffold containing silk nanoparticle loaded VEGF. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **4(8)**: 2836-2846.
- HENCH LL, ROKI N, FENN MB (2014). Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration. *Journal of Molecular Structure*, **1073**: 24-30.
- HERMANS K, VAN DEN PLAS D, KERIMOVA S, CARLEER R, ADRIAENSENS P, WEYENBERG W, LUDWIG A (2014). Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A. *Int J Pharm*, **472(1-2)**: 10-19.
- HIXSON AW, CROWELL JH (1931). Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Industrial And Engineering Chemistry*, **23(8)**: 923-931.
- HO MH, CHANG HC, CHANG YC, CLAUDIA J, LIN TC, CHANG PC (2017). PDGF-metronidazole-encapsulated nanofibrous functional layers on collagen membrane promote alveolar ridge regeneration. *Int J Nanomedicine*, **12**: 5525-5535.
- HU K, OLSEN BR (2016). The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*, **91**: 30-38.
- HUANG Y, CELIKTEN B, DE FARIA VASCONCELOS K, FERREIRA PINHEIRO NICOLIELO L, LIPPIATT N, BUYUKSUNGUR A, JACOBS R, ORHAN K (2017). Micro-CT and nano-CT analysis of filling quality of three different endodontic sealers. *Dentomaxillofac Radiol*, **46(8)**: 1-8.

- HUGHES FJ. (2015). Periodontium and Periodontal Disease. In: *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* Ed.: Vishwakarma, A., Sharpe, P., Shi, S., Ramalingam, M.: Elsevier. 433-444.
- IBRAHIM F, EL-DEEN AK, EL ABASS SA, SHIMIZU K (2017). An ecofriendly green liquid chromatographic method for simultaneous determination of nicotinamide and clindamycin phosphate in pharmaceutical gel for acne treatment. *J Food Drug Anal*, **25(3)**: 741-747.
- ICH-Q2(R1). (2005). Guideline, I.C.H. Validation of analytical procedures: text and methodology.
- ITO F, FUJIMORI H, KAWAKAMI H, KANAMURA K, MAKINO K (2012). Optimized preparation of biodegradable polymer particles encapsulating low-molecular-weight hydrophilic drugs. *Colloid Surface A*, **402**: 29-36.
- ITO F, FUJIMORI H, MAKINO K (2014). Preparation of (hydrophilic) INZ/PLGA particles (microcapsules) employing a unique frozen water phase - investigation of optimal formulation. *Colloid Surface A*, **443**: 356-362.
- IVIGLIA G, KARGOZAR S, BAINO F (2019). Biomaterials, current strategies, and novel nano-technological approaches for periodontal regeneration. *J Funct Biomater*, **10(3)**: 1-36.
- JACOB SA (2017). Guided tissue regeneration: A review. *Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy*, **6(3)**: 1-7.
- JAIN AP, PUNDIR S, SHARMA A (2013). Bone morphogenetic proteins: The anomalous molecules. *J Indian Soc Periodontol*, **17(5)**: 583-586.
- JAIN RA (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, **21(23)**: 2475-2490.
- JAYARAMAN P, GANDHIMATHI C, VENUGOPAL JR, BECKER DL, RAMAKRISHNA S, SRINIVASAN DK (2015). Controlled release of drugs in electrospayed nanoparticles for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, **94**: 77-95.
- KALAYCIOGLU Z, TORLAK E, AKIN-EVINGUR G, OZEN I, ERIM FB (2017). Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. *Int J Biol Macromol*, **101**: 882-888.
- KAMPSCHULTE M, LANGHEINIRCH AC, SENDER J, LITZLBAUER HD, ALTHOHN U, SCHWAB JD, ALEJANDRE-LAFONT E, MARTELS G, KROMBACH GA (2016). Nano-computed tomography: Technique and applications. *Rofo*, **188(2)**: 146-154.
- KANG S, YOON JS, LEE JY, KIM HJ, PARK K, KIM SE (2019). Long-term local PDGF delivery using porous microspheres modified with heparin for tendon healing of rotator cuff tendinitis in a rabbit model. *Carbohydr Polym*, **209**: 372-381.

- KARCZEWSKI A, FEITOSA SA, HAMER EI, PANKAJAKSHAN D, GREGORY RL, SPOLNIK KJ, BOTTINO MC (2018). Clindamycin-modified triple antibiotic nanofibers: A stain-free antimicrobial intracanal drug delivery system. *J Endod*, **44(1)**: 155-162.
- KARKI S, KIM H, NA SJ, SHIN D, JO K, LEE J (2016). Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **11(5)**: 559-574.
- KASSEM AA, ISMAIL FA, NAGGAR VF, ABOULMAGD E (2015). Preparation and evaluation of periodontal films based on polyelectrolyte complex formation. *Pharm Dev Technol*, **20(3)**: 297-305.
- KEMPEN DH, LU L, HEIJINK A, HEFFERAN TE, CREEMERS LB, MARAN A, YASZEMSKI MJ, DHERT WJ (2009). Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials*, **30(14)**: 2816-2825.
- KHAJURIA DK, PATIL ON, KARASIK D, RAZDAN R (2018). Development and evaluation of novel biodegradable chitosan based metformin intrapocket dental film for the management of periodontitis and alveolar bone loss in a rat model. *Arch Oral Biol*, **85**: 120-129.
- KHAN N, AMEEDUZZAFAR, KHANNA K, BHATNAGAR A, AHMAD FJ, ALI A (2018). Chitosan coated PLGA nanoparticles amplify the ocular hypotensive effect of forskolin: Statistical design, characterization and in vivo studies. *Int J Biol Macromol*, **116**: 648-663.
- KILICARSLAN M, GORGOZ M. (2012). Preparation and evaluation of periodontal films containing metronidazole. International Symposium on Pharmaceutical Sciences-ISOPS.
- KILICARSLAN M, GORGOZ M (2016). Nano chemotherapeutics in bone metastasis and targeting. *Turk J Pharm Sci*, **13(3)**: 351-357.
- KILICARSLAN M, GORGOZ M, ERIK I. (2015a). The effects of some formulation parameters on clindamycin phosphate loaded chitosan film. International Symposium on Pharmaceutical Sciences-ISOPS.
- KILICARSLAN M, GORGOZ M, KARADAS H. (2014a). Microsphere embedded film formulations to delivery of metronidazole into the periodontal pocket. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS.
- KILICARSLAN M, GUMUSTAS M, YILDIZ S, BAYKARA T (2014b). Preparation and characterization of chitosan-based spray-dried microparticles for the delivery of clindamycin phosphate to periodontal pockets. *Curr Drug Deliv*, **11(1)**: 98-111.
- KILICARSLAN M, ILHAN M, INAL O, ORHAN K (2018). Preparation and evaluation of clindamycin phosphate loaded chitosan/alginate polyelectrolyte complex film as mucoadhesive drug delivery system for periodontal therapy. *Eur J Pharm Sci*, **123**: 441-451.

- KILICARSLAN M, ILHAN M, ORHAN K. (2020). Micro-computed tomography (micro-CT) analysis as a new approach for characterization of drug delivery systems. In: *Micro-Computed Tomography (Micro-CT) in Medicine and Engineering* Ed.: Orhan, K.: Springer International Publishing.
- KILICARSLAN M, INAL M, GORGOZ M. (2015b). In vitro evaluation of mucoadhesive properties of clindamycin phosphate loaded chitosan periodontal films. *International Gazi Pharma Symposium Series-GPSS*.
- KILICARSLAN M, KOERBER M, BODMEIER R (2014c). In situ forming implants for the delivery of metronidazole to periodontal pockets: Formulation and drug release studies. *Drug Dev Ind Pharm*, **40(5)**: 619-624.
- KILICARSLAN M, OZKAN SA, BAYKARA T (2010). LC determination of clindamycin phosphate from chitosan microspheres. *Chromatographia*, **72(9-10)**: 799-805.
- KIM BS, YANG SS, KIM CS (2018). Incorporation of BMP-2 nanoparticles on the surface of a 3D-printed hydroxyapatite scaffold using an epsilon-polycaprolactone polymer emulsion coating method for bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **170**: 421-429.
- KIM JE, YI WJ, HEO MS, LEE SS, CHOI SC, HUH KH (2015). Three-dimensional evaluation of human jaw bone microarchitecture: Correlation between the microarchitectural parameters of cone beam computed tomography and micro-computer tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, **120(6)**: 762-770.
- KIM M, PARK JH (2012). Enantioseparation of chiral acids and bases on a clindamycin phosphate-modified zirconia monolith by capillary electrochromatography. *J Chromatogr A*, **1251**: 244-248.
- KIM YH, TABATA Y (2015). Dual-controlled release system of drugs for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, **94**: 28-40.
- KOMOTO D, FURUIKE T, TAMURA H (2019). Preparation of polyelectrolyte complex gel of sodium alginate with chitosan using basic solution of chitosan. *Int J Biol Macromol*, **126**: 54-59.
- KONDAVEETI S, BUENO PVA, CARMONA-RIBEIRO AM, ESPOSITO F, LINCOPAN N, SIERAKOWSKI MR, PETRI DFS (2018). Microbicidal gentamicin-alginate hydrogels. *Carbohydr Polym*, **186**: 159-167.
- KUMRIA R, AL-DHUBIAB BE, SHAH J, NAIR AB (2018). Formulation and evaluation of chitosan-based buccal bioadhesive films of zolmitriptan. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, **13(2)**: 133-143.
- LAI HL, ABU'KHALIL A, CRAIG DQ (2003). The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges. *Int J Pharm*, **251(1-2)**: 175-181.

- LAI KL, FANG Y, HAN H, LI Q, ZHANG S, LI HY, CHOW SF, LAM TN, LEE WYT (2018). Orally-dissolving film for sublingual and buccal delivery of ropinirole. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **163**: 9-18.
- LAUDENBACH JM, SIMON Z (2014). Common dental and periodontal diseases: Evaluation and management. *Med Clin North Am*, **98(6)**: 1239-1260.
- LEE BB, BHANDARI BR, HOWES T (2018). Gelation of an alginate film via spraying of calcium chloride droplets. *Chemical Engineering Science*, **183**: 1-12.
- LI S, DONG S, XU W, TU S, YAN L, ZHAO C, DING J, CHEN X (2018). Antibacterial hydrogels. *Adv Sci (Weinh)*, **5(5)**: 1700527.
- LIENEMANN PS, LUTOLF MP, EHRBAR M (2012). Biomimetic hydrogels for controlled biomolecule delivery to augment bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, **64(12)**: 1078-1089.
- LINDEBOOM JA, FRENKEN JW, TUK JG, KROON FH (2006). A randomized prospective controlled trial of antibiotic prophylaxis in intraoral bone-grafting procedures: preoperative single-dose penicillin versus preoperative single-dose clindamycin. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **35(5)**: 433-436.
- LIU J, KERNS DG (2014). Mechanisms of guided bone regeneration: A review. *Open Dent J*, **8**: 56-65.
- LUNA LE. (1968). Manual of histological staining methods of the armed forces institute of pathology. (Ed.: Luna, L. E.): McGraw-Hill Book Company.
- MADHUMATHI K, REKHA LJ, KUMAR TSS (2018). Tailoring antibiotic release for the treatment of periodontal infrabony defects using bioactive gelatin-alginate/apatite nanocomposite films. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **43**: 57-64.
- MAKADIA HK, SIEGEL SJ (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*, **3(3)**: 1377-1397.
- MALVERN. (2009). *Malvern Instruments Zetasizer Nano User Manual*. Zetasizer Nano, (5).
- MANTE A, HEIDER M, ZLOMKE C, MADER K (2016). PLGA nanoparticles for peroral delivery: How important is pancreatic digestion and can we control it? *Eur J Pharm Biopharm*, **108**: 32-40.
- MENG X, TIAN F, YANG J, HE CN, XING N, LI F (2010). Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *J Mater Sci Mater Med*, **21(5)**: 1751-1759.
- MIRTIC J, ILAS J, KRISTL J (2018). Influence of different classes of crosslinkers on alginate polyelectrolyte nanoparticle formation, thermodynamics and characteristics. *Carbohydr Polym*, **181**: 93-102.

- MIYAZAKI S, NAKAYAMA A, ODA M, TAKADA M, ATTWOOD D (1995). Drug release from oral mucosal adhesive tablets of chitosan and sodium alginate. *International Journal of Pharmaceutics*, **118**: 257-263.
- MOHAMED AI, AHMED OA, AMIN S, ELKADI OA, KASSEM MA (2015a). In-vivo evaluation of clindamycin release from glyceryl monooleate-alginate microspheres by NIR spectroscopy. *Int J Pharm*, **494(1)**: 127-135.
- MONTERO-MIRALLES P, MARTIN-GONZALEZ J, ALONSO-EZPELETA O, JIMENEZ-SANCHEZ MC, VELASCO-ORTEGA E, SEGURA-EGEA JJ (2018). Effectiveness and clinical implications of the use of topical antibiotics in regenerative endodontic procedures: A review. *Int Endod J*, **51(9)**: 981-988.
- MOORE WR, GRAVES SE, BAIN GI (2001). Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*, **71(6)**: 354-361.
- MORALES JO, HUANG SY, WILLIAMS RO, MCCONVILLE JT (2014). Films loaded with insulin-coated nanoparticles (ICNP) as potential platforms for peptide buccal delivery. *Colloid Surface B*, **122**: 38-45.
- NESIC A, GORDIC M, ONJIA A, DAVIDOVIC S, MILJKOVIC M, DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC S (2017). Chitosan-triclosan films for potential use as bio-antimicrobial bags in healthcare sector. *Mater Lett*, **186**: 368-371.
- NG SF, TAN SL (2015). Development and in vitro assessment of alginate bilayer films containing the olive compound hydroxytyrosol as an alternative for topical chemotherapy. *Int J Pharm*, **495(2)**: 798-806.
- NGUYEN CT, NGUYEN TT, NGUYEN TT, NGUYEN PPT, NGUYEN AD, TRAN LT, TRAN-VAN H (2017). Preparation and in vitro evaluation of FGF-2 incorporated carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydr Polym*, **173**: 114-120.
- NIE L, ZHANG G, HOU R, XU H, LI Y, FU J (2015). Controllable promotion of chondrocyte adhesion and growth on PVA hydrogels by controlled release of TGF-beta1 from porous PLGA microspheres. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **125**: 51-57.
- OH T-J, YOON J, MISCH CE, WANG H-L (2002). The causes of early implant bone loss: Myth or science? *J Periodontol*, **73(3)**: 322-333.
- OZ UC, KÜÇÜKTÜRKMEN B, DEVRIM B, SAKA OM, BOZKIR A (2019). Development and optimization of alendronate sodium loaded PLGA nanoparticles by central composite design. *Macromolecular Research*: 1-10.
- OZGUL BM, ORHAN K, OZ FT (2015). Micro-computed tomographic analysis of progression of artificial enamel lesions in primary and permanent teeth after resin infiltration. *J Oral Sci*, **57(3)**: 177-183.
- ÖZKAN Y, SAVAŞER A, TAŞ Ç, ÖZKAN CK, BAYRAK Z, EŞİM Ö, ÖZKAN S. (2011). İlaçların analiz ve kalite kontrollerinde kullanılan analitik yöntemlerin

geçerliliği (Validasyon). (Ed.: Bayraktar, M. Z. Vol. 87). Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, Etlik, Ankara.

- PARK KH, KIM H, MOON S, NA K (2009). Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. *J Biosci Bioeng*, **108(6)**: 530-537.
- PASSOS PC, MORO J, BARCELOS RCS, DA ROSA HZ, VEY LT, BURGUER ME, MACIEL RM, DANESI CC, EDWARDS PC, BOTTINO MC, KANTORSKI KZ (2019). Nanofibrous antibiotic-eluting matrices: Biocompatibility studies in a rat model. *J Biomed Mater Res B*: 1-10.
- PATEL P, PATEL P (2015). Formulation and evaluation of clindamycin HCL in situ gel for vaginal application. *Int J Pharm Investig*, **5(1)**: 50-56.
- PATRA S, BAL DK, GANGULY S (2016). Diffusion in and around alginate and chitosan films with embedded sub-millimeter voids. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **59**: 61-69.
- PERNI S, CASERTA S, PASQUINO R, JONES SA, PROKOPOVICH P (2019). Prolonged antimicrobial activity of PMMA bone cement with embedded gentamicin-releasing silica nanocarriers. *ACS Applied Bio Materials*, **2(5)**: 1850-1861.
- PERUGINI P, GENTA I, CONTI B, MODENA T, PAVANETTO F (2003). Periodontal delivery of ipriflavone: New chitosan/PLGA film delivery system for a lipophilic drug. *Int J Pharm*, **252(1-2)**: 1-9.
- PHAECHAMUD T, SETTHAJINDALERT O (2017). Cholesterol in situ forming gel loaded with doxycycline hyclate for intra-periodontal pocket delivery. *Eur J Pharm Sci*, **99**: 258-265.
- PILIPCHUK SP, PLONKA AB, MONJE A, TAUT AD, LANIS A, KANG B, GIANNOBILE WV (2015). Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dent Mater*, **31(4)**: 317-338.
- PLATZER DJ, WHITE BA (2006). Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41(1)**: 84-88.
- PRAKASH J, KUMAR TS, VENKATAPRASANNA KS, NIRANJAN R, KAUSHIK M, SAMAL DB, VENKATASUBBU GD (2019). PVA/alginate/hydroxyapatite films for controlled release of amoxicillin for the treatment of periodontal defects. *Appl Surf Sci*, **495**: 1-9.
- QASIM SB, NAJEEB S, DELAINE-SMITH RM, RAWLINSON A, UR REHMAN I (2017). Potential of electrospun chitosan fibers as a surface layer in functionally graded GTR membrane for periodontal regeneration. *Dent Mater*, **33(1)**: 71-83.

- QU X, HE F, TAN HQ, YU YM, AXRAP A, WANG M, DAI K, ZHANG Z, YANG F, WANG SG, KOHN J, LIU CS (2016). Self-assembly of dual drug-delivery coating for synergistic bone regeneration. *J Mater Chem B*, **4(28)**: 4901-4912.
- RAB0033 S-A. RAB0033-Certificate of Analysis BMP-7 ELISA kit.
- RAMINENI SK, FOWLER CB, FISHER PD, CUNNINGHAM LL, PULEO DA (2015). Effects of epidermal growth factor-loaded mucoadhesive films on wounded oral tissue rafts. *Biomed Mater*, **10(1)**: 015026.
- RAUTA PR, DAS NM, NAYAK D, ASHE S, NAYAK B (2016). Enhanced efficacy of clindamycin hydrochloride encapsulated in PLA/PLGA based nanoparticle system for oral delivery. *IET Nanobiotechnol*, **10(4)**: 254-261.
- RAVICHANDRAN V, JAYAKRISHNAN A (2018). Synthesis and evaluation of anti-fungal activities of sodium alginate-amphotericin B conjugates. *Int J Biol Macromol*, **108**: 1101-1109.
- REDDI AH (1992). Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **4(5)**: 850-855.
- REDDI AH (1998). Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology*, **16(3)**: 247-252.
- RIDER CC, MULLOY B (2010). Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J*, **429(1)**: 1-12.
- RITGER PL, PEPPAS NA (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, **5**: 23-36.
- RODAN GA, MARTIN TJ (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, **289(5484)**: 1508-1514.
- RUHE PQ, BOERMAN OC, RUSSEL FG, SPAUWEN PH, MIKOS AG, JANSEN JA (2005). Controlled release of rhBMP-2 loaded poly(dl-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites in vivo. *J Control Release*, **106(1-2)**: 162-171.
- SAH AK, DEWANGAN M, SURESH PK (2019). Potential of chitosan-based carrier for periodontal drug delivery. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, **178**: 185-198.
- SAHAI N, AHMAD N, GOGOI M (2018). Nanoparticles based drug delivery for tissue regeneration using biodegradable scaffolds: A review. *Current Pathobiology Reports*, **6(4)**: 219-224.
- SAHIN A, ESENDAGLI G, YERLIKAYA F, CABAN-TOKTAS S, YOYEN-ERMIS D, HORZUM U, AKTAS Y, KHAN M, COUVREUR P, CAPAN Y (2017). A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, **45(8)**: 1657-1664.

- SAKA OM, ÖZ UC, KÜÇÜKTÜRKMEN B, DEVRIM B, BOZKIR A (2018). Central composite design for optimization of zoledronic acid loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Innovation*: 1-12.
- SALMON PL, OHLSSON C, SHEFELBINE SJ, DOUBE M (2015). Structure model index does not measure rods and plates in trabecular bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **6**: 162.
- SANKALIA MG, MASHRU RC, SANKALIA JM, SUTARIYA VB (2007). Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. *Eur J Pharm Biopharm*, **65(2)**: 215-232.
- SANNA V, PALA N, SECHI M (2014). Targeted therapy using nanotechnology: Focus on cancer. *Int J Nanomedicine*, **9**: 467-483.
- SAVASER A, ESIM O, KURBANOGLU S, OZKAN SA, OZKAN Y. (2018). Current perspectives on drug release studies from polymeric nanoparticles. In: *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery* Ed.: Grumezescu, A. M. 101-145.
- SCHMITT RAHNER M, HALISCH M, PERES FERNANDES C, WELLER A, SAMPAIO SANTIAGO DOS SANTOS V (2018). Fractal dimensions of pore spaces in unconventional reservoir rocks using X-ray nano- and micro-computed tomography. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*, **55**: 298-311.
- SEO BB, CHOI H, KOH JT, SONG SC (2015). Sustained BMP-2 delivery and injectable bone regeneration using thermosensitive polymeric nanoparticle hydrogel bearing dual interactions with BMP-2. *J Control Release*, **209**: 67-76.
- SHAH SR, TATARA AM, LAM J, LU S, SCOTT DW, BENNETT GN, VAN DEN BEUCKEN JJJP, JANSEN JA, WONG ME, MIKOS AG (2016). Polymer-based local antibiotic delivery for prevention of polymicrobial infection in contaminated mandibular implants. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2(4)**: 558-566.
- SHANKAR S, WANG LF, RHIM JW (2016). Preparations and characterization of alginate/silver composite films: Effect of types of silver particles. *Carbohydr Polym*, **146**: 208-216.
- SHARMA S, PARMAR A, KORI S, SANDHIR R (2016). PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **80**: 30-40.
- SHIM JH, KIM SE, PARK JY, KUNDU J, KIM SW, KANG SS, CHO DW (2014). Three-dimensional printing of rhBMP-2-loaded scaffolds with long-term delivery for enhanced bone regeneration in a rabbit diaphyseal defect. *Tissue Eng Part A*, **20(13-14)**: 1980-1992.
- SHIN SY, RIOS HF, GIANNOBILE WV, OH T-J. (2014). Periodontal Regeneration: Current Therapies. In: *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* Ed.: Vishwakarma, A., et al., eds. . . Academic Press. 459-469.

- SHU XZ, ZHU KJ, SONG W (2001). Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. *Int J Pharm*, **212(1)**: 19-28.
- SIEPMANN J, PEPPAS NA (2001). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev*, **48(2-3)**: 139-157.
- SIEPMANN J, SIEPMANN F (2008). Mathematical modeling of drug delivery. *Int J Pharm*, **364(2)**: 328-343.
- SILINDIR M, OZER AY (2009). Sterilization methods and the comparison of e-beam sterilization with gamma radiation sterilization. *FABAD J. Pharm. Sci.*, **34**: 43-53.
- SMITH BT, WATSON E, HANNA IA, MELVILLE JC, MIKOS AG, WONG ME. (2019). Craniofacial regenerative medicine. In: *Principles of Regenerative Medicine* Ed.: Atala, A., Lanza, R., Mikos, T., Nerem, R. 887-905.
- SOWMYA S, BUMGARDENER JD, CHENNAZHI KP, NAIR SV, JAYAKUMAR R (2013). Role of nanostructured biopolymers and bioceramics in enamel, dentin and periodontal tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, **38(10-11)**: 1748-1772.
- STREET J, BAO M, DEGUZMAN L, BUNTING S, PEALE FV, JR., FERRARA N, STEINMETZ H, HOEFFEL J, CLELAND JL, DAUGHERTY A, VAN BRUGGEN N, REDMOND HP, CARANO RA, FILVAROFF EH (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99(15)**: 9656-9661.
- SUN SJ, ZHANG YL, ZENG DL, ZHANG SM, ZHANG FQ, YU WQ (2018). PLGA film/titanium nanotubes as a sustained growth factor releasing system for dental implants. *J Mater Sci-Mater M*, **29(9)**: 1-8.
- SUN W, CHEN G, WANG F, QIN Y, WANG Z, NIE J, MA G (2018). Polyelectrolyte-complex multilayer membrane with gradient porous structure based on natural polymers for wound care. *Carbohydr Polym*, **181**: 183-190.
- SWAIN MV, XUE J (2009). State of the art of Micro-CT applications in dental research. *Int J Oral Sci*, **1(4)**: 177-188.
- TAGHAVI S, RAMEZANI M, ALIBOLANDI M, ABNOUS K, TAGHDISI SM (2017). Chitosan-modified PLGA nanoparticles tagged with 5TR1 aptamer for in vivo tumor-targeted drug delivery. *Cancer Lett*, **400**: 1-8.
- TAMADDON L, MOSTAFAVI SA, KARKHANE R, RIAZI-ESFAHANI M, DORKOOSH FA, RAFIEE-TEHRANI M (2015). Thermoanalytical characterization of clindamycin-loaded intravitreal implants prepared by hot melt extrusion. *Adv Biomed Res*, **4**: 147.
- TANG D, TARE RS, YANG LY, WILLIAMS DF, OU KL, OREFFO RO (2016). Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*, **83**: 363-382.

- TELLER M, GOPP U, NEUMANN HG, KUHN KD (2007). Release of gentamicin from bone regenerative materials: An in vitro study. *J Biomed Mater Res B*, **81(1)**: 23-29.
- TOPAL GR, DEVRIM B, ERYILMAZ M, BOZKIR A (2018). Design of ciprofloxacin-loaded nano-and microcomposite particles for dry powder inhaler formulations: Preparation, in vitro characterisation, and antimicrobial efficacy. *J Microencapsul*, **35(6)**: 533-547.
- UEDA H, HONG L, YAMAMOTO M, SHIGENO K, INOUE M, TOBA T, YOSHITANI M, NAKAMURA T, TABATA Y, SHIMIZU Y (2002). Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor-beta 1 to promote bone repair in skull defects in rabbits. *Biomaterials*, **23(4)**: 1003-1010.
- UNAGOLLA JM, JAYASURIYA AC (2018). Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. *Eur J Pharm Sci*, **114**: 199-209.
- URIST MR, STRATES BS (1971). Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, **50(6)**: 1392-1406.
- USP30. (2007). The United States Pharmacopoeia (USP 30 - NF 25).
- VAN DYKE TE, HASTURK H, KANTARCI A, FREIRE MO, NGUYEN D, DALLI J, SERHAN CN (2015). Proresolving nanomedicines activate bone regeneration in periodontitis. *J Dent Res*, **94(1)**: 148-156.
- VARAN C, WICKSTROM H, SANDLER N, AKTAS Y, BILENSOY E (2017). Inkjet printing of antiviral PCL nanoparticles and anticancer cyclodextrin inclusion complexes on bioadhesive film for cervical administration. *Int J Pharm*, **531(2)**: 701-713.
- VENKATESAN J, LEE JY, KANG DS, ANIL S, KIM SK, SHIM MS, KIM DG (2017). Antimicrobial and anticancer activities of porous chitosan-alginate biosynthesized silver nanoparticles. *Int J Biol Macromol*, **98**: 515-525.
- VISSCHER LE, DANG HP, KNACKSTEDT MA, HUTMACHER DW, TRAN PA (2018). 3D printed Polycaprolactone scaffolds with dual macro-microporosity for applications in local delivery of antibiotics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **87**: 78-89.
- VO TN, KASPER FK, MIKOS AG (2012). Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, **64(12)**: 1292-1309.
- VRANIC E, PLANINSEK O, TIVADAR A, HADZOVIC S, SRCIC S (2007). Physico-chemical characterisation of different clindamycin phosphate samples. *Bosn J Basic Med Sci*, **7(2)**: 180-187.
- WANG B, GUO Y, CHEN X, ZENG C, HU Q, YIN W, LI W, XIE H, ZHANG B, HUANG X, YU F (2018). Nanoparticle-modified chitosan-agarose-gelatin

- scaffold for sustained release of SDF-1 and BMP-2. *Int J Nanomedicine*, **13**: 7395-7408.
- WANG C, LUO W, LI P, LI S, YANG Z, HU Z, LIU Y, AO N (2017). Preparation and evaluation of chitosan/alginate porous microspheres/Bletilla striata polysaccharide composite hemostatic sponges. *Carbohydr Polym*, **174**: 432-442.
- WONG A, RAZZINO CA, SILVA TA, FATIBELLO O (2016). Square-wave voltammetric determination of clindamycin using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and gold nanoparticles within a crosslinked chitosan film. *Sensor Actuat B-Chem*, **231**: 183-193.
- WONG CF, YUEN KH, PEH KK (1999). An in-vitro method for buccal adhesion studies: importance of instrument variables. *Int J Pharm*, **180(1)**: 47-57.
- WU C, CHANG J (2014). Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors. *J Control Release*, **193**: 282-295.
- WU T, LI Y, SHEN N, YUAN C, HU Y (2018). Preparation and characterization of calcium alginate-chitosan complexes loaded with lysozyme. *Journal of Food Engineering*, **233**: 109-116.
- WYTRWAL M, KOCZURKIEWICZ P, ZRUBEK K, NIEMIEC W, MICHALIK M, KOZIK B, SZNELER E, BERNASIK A, MADEJA Z, NOWAKOWSKA M, KEPCZYNSKI M (2016). Growth and motility of human skin fibroblasts on multilayer strong polyelectrolyte films. *J Colloid Interface Sci*, **461**: 305-316.
- XAVIER JR, THAKUR T, DESAI P, JAISWAL MK, SEARS N, COSGRIFF-HERNANDEZ E, KAUNAS R, GAHARWAR AK (2015). Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. *Acs Nano*, **9(3)**: 3109-3118.
- XIE H, CHEN X, SHEN X, HE Y, CHEN W, LUO Q, GE W, YUAN W, TANG X, HOU D, JIANG D, WANG Q, LIU Y, LIU Q, LI K (2018). Preparation of chitosan-collagen-alginate composite dressing and its promoting effects on wound healing. *Int J Biol Macromol*, **107(Pt A)**: 93-104.
- XU J, XIA R, ZHENG L, YUAN T, SUN R (2019). Plasticized hemicelluloses/chitosan-based edible films reinforced by cellulose nanofiber with enhanced mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, **224**: 1-9.
- YAN X, YU C, ZHOU X, TANG J, ZHAO D (2004). Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities. *Angew Chem Int Ed Engl*, **43(44)**: 5980-5984.
- YAN XL, KHOR E, LIM LY (2001). Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. *J Biomed Mater Res*, **58(4)**: 358-365.

- YE C, CHI H (2018). A review of recent progress in drug and protein encapsulation: Approaches, applications and challenges. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **83**: 233-246.
- YEŞİLADA E, ZÜLFİKAR H, TUNÇTAN B, AKTAY G, ÖZKAN Y, AYDIN A, KÜÇÜKGÜZEL İ, SAVAŞER A, BUHARALIOĞLU K. (Eds.). (2015) İlaç ve Eczacılık Terimleri Sözlüğü. Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları.
- YILGOR P, HASIRCI N, HASIRCI V (2010). Sequential BMP-2/BMP-7 delivery from polyester nanocapsules. *J Biomed Mater Res A*, **93(2)**: 528-536.
- ZANG S, MU R, CHEN F, WEI X, ZHU L, HAN B, YU H, BI B, CHEN B, WANG Q, JIN L (2019). Injectable chitosan/beta-glycerophosphate hydrogels with sustained release of BMP-7 and ornidazole in periodontal wound healing of class III furcation defects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **99**: 919-928.
- ZEISBERG M, KALLURI R (2008). Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, **23(9)**: 1395-1398.
- ZHANG F, SONG Q, HUANG X, LI F, WANG K, TANG Y, HOU C, SHEN H (2016). A novel high mechanical property plga composite matrix loaded with nanodiamond-phospholipid compound for bone tissue engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*, **8(2)**: 1087-1097.
- ZHANG Q, QIN M, ZHOU X, NIE W, WANG W, LI L, HE C (2018). Porous nanofibrous scaffold incorporated with S1P loaded mesoporous silica nanoparticles and BMP-2 encapsulated PLGA microspheres for enhancing angiogenesis and osteogenesis. *J Mater Chem B*, **6(42)**: 6731-6743.
- ZHANG S, GUO Y, DONG Y, WU Y, CHENG L, WANG Y, XING M, YUAN Q (2016). A novel nanosilver/nanosilica hydrogel for bone regeneration in infected bone defects. *ACS Appl Mater Interfaces*, **8(21)**: 13242-13250.
- ZHANG S, ULUDAG H (2009). Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharm Res*, **26(7)**: 1561-1580.
- ZHUANG YP, SHEN H, YANG F, WANG X, WU DC (2016). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticle/4-arm-PEG hybrid hydrogels with controlled porous structures. *Rsc Adv*, **6(59)**: 53804-53812.

EKLER

Ek 1. Hayvan Deneyi Yerel Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 22/06/2016
TOPLANTI NO : 2016-14
DOSYA NO : 2016-105
KARAR NO : 2016-14-146

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Müge Kılıçarslan'ın yaptığı, araştırmacı olarak Dr.Dt.Nilsun Bağış, Arş.Gör.Miray Görgöz ve Dr.M.Eray Alçıgır'ın katıldığı "Dental Cerrahi İşlemler Sonrasında Kemik Rejenerasyonunda Kullanılmak Üzere Büyüme Faktörü ve Antibiyotik Yüklü Nanopartikül, Film ve Greft Materyali Kombinasyonlarının Hazırlanması ve *In vivo* Değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11. maddesi ölçütlerine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü :Sıçan
Hayvan Sayısı :270
Geçerlilik Süresi :02/03/2017-02/03/2020

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zoooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Gülnur GÖLLÜ BAHADİR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Attıla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm. Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun ÇOSKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

Ek 2. Deneý Hayvanları Kullanım Sertifikası


TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

MİRAY GÖRGÖZ

Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (ANKÜSEM) ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu işbirliği çerçevesinde 17 - 26 Haziran 2013 tarihleri arasında düzenlenen “*Deneý Hayvanları Kullanım Sertifikası*” eğitimini başarı ile tamamlayarak sertifika almaya hak kazanmıştır.


Prof. Dr. Oğuz SARİMEHMETOĞLU
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı
Eğitim Programının Kategorisi ve Süresi : B Kategorisi - 80 saat


Prof. Dr. Erkan İBİŞ
Rektör


Prof. Dr. Mualla SELÇUK
ANKÜSEM Müdürü

Belge No: 5782

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Miray
Soyadı : İlhan
Doğum yeri ve tarihi : Elazığ / 19.08.1989
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu : Evli
İletişim adresi : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik
Teknoloji Anabilim Dalı, Anadolu/ANKARA
Telefonu : +90 5319618142
e-mail : miraygilhan@gmail.com; miraygorgoz@gmail.com

II- Eğitimi

Lisans : 2007-2012 / Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Lise : 2003-2007 / Elazığ Anadolu Lisesi
İlköğretim : 1995-2003 / Evren Paşa İlköğretim Okulu (Elazığ)
Yabancı dili : İngilizce

IV- Mesleki Deneyimi

Araştırma görevlisi, 2012- Devam ediyor.

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği - TÜFTAD

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler

1. Kılıçarslan, M., **İlhan, M.**, Inal, O., Orhan, K. (2018). Preparation and evaluation of clindamycin phosphate loaded chitosan/alginate polyelectrolyte complex film as mucoadhesive drug delivery system for periodontal therapy. Eur J Pharm Sci, 123, 441–451. doi:10.1016/j.ejps.2018.08.007 (SCI)
2. Kılıçarslan, M., **Görgöz, M.** (2016). Nano Chemotherapeutics in Bone Metastasis and Targeting. Turk J Pharm Sci, 13(3), 351-357. doi:10.4274/tjps.2016.12 (ESCI)

Kitap bölümü

1. Kilicarslan, M., **Ilhan, M.**, Orhan, K. (2020). “Micro-Computed Tomography (Micro-CT) Analysis as a New Approach for Characterization of Drug Delivery Systems”, Micro-Computed Tomography (Micro-CT) in Medicine and Engineering, Ed. Orhan, K., ISBN: 978-3-030-16641-0: Springer International Publishing.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. M. Kılıçarslan, **M. İlhan**, K. Orhan, “Non-Destructive 3D Imaging and Quantitative Analysis of Clindamycin Phosphate Loaded PLGA Nanoparticles by Using Nano-CT”, Sözlü Sunum (EUFEPS, Annual Meeting of the European Federation of Pharmaceutical Sciences, Personalized Medicines, targeted Therapies and Precision Drug Delivery, 06-09 Mart 2019, Frankfurt).
2. **M. İlhan**, M. Kilicarslan, “The Effect of Chitosan Type and Concentration on Complexation with Sodium Alginate in Film Formulations” başlıklı poster (12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, ISOPS 2018, 26-29 Haziran 2018, Ankara).
3. M. Kilicarslan, **M. İlhan**, “The effects of concentration and ratio of the polymers on the characteristics of the alginate-chitosan polyelectrolyte complex film” başlıklı poster (11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology – 11th PBP World Meeting, 19-22 Mart 2018, Granada).
4. M. Kılıçarslan, **M. Görgöz**, “Preparation and Evaluation of Clindamycin Phosphate Loaded Chitosan-Alginate Complex Films for Periodontal Application” başlıklı poster (2nd International Conference and Expo on Drug Discovery & Designing (Drug Discovery 2016, Roma).
5. M. Kılıçarslan, Ö. İnal, **M. Görgöz**, “In Vitro Evaluation Of Mucoadhesive Properties Of Clindamycin Phosphate Loaded Chitosan Periodontal Films” başlıklı poster (International Gazi Pharma Symposium Series-GPSS 2015, Antalya).
6. M. Kılıçarslan, **M. Görgöz**, İ. Erik, “The Effects of Some Formulation Parameters on Clindamycin Phosphate Loaded Chitosan Film” başlıklı poster (11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences-ISOPS 2015, Ankara).
7. O. Gun, A.D. Ergin, **M. Gorgoz**, G.R.Camca, S. Arisoy, N. Yuksel, “Comperative Evaluation of Granulac® - Starch Granules Produced by Wet Granulation Method Using PVP Binder in a Low Shear Mixer Granulator” başlıklı poster (11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences-ISOPS 2015, Ankara).
8. M. Kılıçarslan, **M. Görgöz**, H. Karadaş, “Microsphere Embedded Film Formulations to Delivery of Metronidazole into the Periodontal Pocket” başlıklı

poster (17th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2014, Antalya).

9. M. Kılıçarslan, **M. Görgöz**, “Preparation And Evaluation Of Periodontal Films Containing Metronidazole” başlıklı poster (International Symposium on Pharmaceutical Sciences-ISOPS 2012, Ankara)

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeleri

1. “Periodontal cep içine metronidazol verilışı için mikroküre yüklü filmlerin hazırlanması üzerine çalışmalar” başlıklı Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), Hızlandırılmış Destek Projesi, Yardımcı Araştırmacı, (Proje Kodu: 13H3336003) 26.12.2013-26.12.2014.
2. “Dental cerrahi işlemler sonrasında kemik rejenerasyonunda kullanılmak üzere büyüme faktörü ve antibiyotik yüklü nanopartikül, film ve greft materyali kombinasyonlarının hazırlanması ve mikro-BT ile değerlendirilmesi” başlıklı Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), Altyapı Projesi, Araştırmacı, (Proje Kodu: 17A0234001) 16.01.2017 - Devam ediyor.

Verdiği seminerler

1. Kemik metastazlarında nanokemoterapötikler ve hedeflendirilmeleri, 2014.
2. Osteosarkomda İnhalasyon Kemoterapisi, 2015.
3. *In Situ* Mikroenkapsülasyon, 2016.

VIII- Diğer Bilgiler

Katıldığı kurslar, eğitim seminerleri ve diğer etkinlikler

1. Uygun Antibiyotik Kullanımı ve Klinik Eczacı, Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Meslek İçi Eğitim, 24-25 Mart 2012, Ankara.
2. İyi Eczacılık Uygulamaları/Klinik Eczacılık/Farmasötik Bakım, Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi, Meslek İçi Eğitim, 10-15 Nisan 2012, Ankara.
3. Endokrin ve Romatizmal Hastalıklar, Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi, Meslek İçi Eğitim, 24-27 Mayıs 2012, Ankara.
4. Orta Üzeri (Upper Intermediate) Düzey İngilizce Kurs Programı, Ankara Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu, 8 Ekim 2012-19 Nisan 2013, Ankara.
5. Nadir Hastalıklar ve Yetim İlaçlar: Türkiye ve Dünyadaki Uygulamaları, Hacettepe Üniversitesi-FATUM, 21 Haziran 2013, Ankara.
6. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi, 17 Haziran-26 Haziran 2013, Ankara.

7. İleri Teknoloji Ürünleri ve Geri Ödemeleri, Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD), 29-31 Mayıs 2015, Edirne.
8. İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi, 22 Haziran 2015, Ankara.
9. Avrupa Bilim ve Eğlence Günü, Ankara Üniversitesi Çocuk Bilim Merkezi Koordinatörlüğü, 2 Ekim 2015.
10. İlaçta İnovasyon ve AR-GE, Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD), 5-6 Mayıs 2017, Ankara.
11. Bilim Yolculuğu, TÜBİTAK 4007 Bilim Şenlikleri Destekleme Programı, 4-6 Ekim 2017, Ankara.
12. 2. Uluslararası Micro CT Güz Okulu, Ankara Üniversitesi, 16-21 Ekim 2017, Ankara.
13. Araştırma Görevlileri için Eğiticilerin Eğitimi Sertifika Programı, Ankara Üniversitesi, 4 Aralık 2017-9 Ocak 2018, Ankara.
14. Biyoteknolojik Ürünlerde Üretim ve İyi İmalat uygulamaları, Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD), 6 Nisan 2018, Ankara.
15. Güçlü Türk İlaç Sanayiine Giden Yol, Ankara Üniversitesi, 29 Haziran 2018, Ankara.