



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALLANTOİN YÜKLÜ KİTOZAN/KOLLAJEN SKAFOLDLARIN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

GİZEM KARACA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi GÖKÇEN YAŞAYAN

2018-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Farmasötik Teknoloji
Tez Sahibi : Gizem KARACA
Tez Başlığı : Allantoin yüklü kitozan/kollajen skafoldların hazırlanması ve karakterizasyonu
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Ab.D
Sınav Tarihi : 21.11.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Dr. Öğr. Üyesi GÖKÇEN YAŞAYAN

Kurumu

Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Timuçin UĞURLU

Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. M. Sedef ERDAL

İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 28 Kasım 2018... tarih ve 21 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gizem KARACA

İmza



TEŞEKKÜR

Farmasötik Teknoloji alanında engin bilgi ve tecrübelerinden daima yararlanmamı sağlayan, tez süresi boyunca beni her konuda içtenlikle destekleyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gökçen Yaşayan'a;

Lisansüstü öğretim hayatıma katkılarından dolayı Marmara Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı bünyesindeki değerleri hocalarıma;

Tez sürem boyunca her daim engin bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen, desteğini esirgemeyen değerli yöneticim Nur Pehlivan Akalın'a, maddi ve manevi destekleri için Sanovel İlaç Arge bölümündeki değerli çalışma arkadaşlarıma ve Sanovel İlaç Şirketi'ne;

Tez çalışmam boyunca bana evini açan sevgili dostum Melis Bakay Aygar'a ve manevi ablam Merve Ergun Dönmez'e;

Tez çalışmama ait hücre kültürü çalışmalarının gerçekleşmesinde sağlamış oldukları destekler için İstinye Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Ayça Bal Öztürk ve Zeynep Püren Akgüner'e;

Tez çalışmama ait mikrokalorimetre analizlerine vermiş oldukları desteklerden dolayı Likrom Analitik Çözümler Paz.San. ve Tic. A.Ş'ye;

Hayatımın her alanında benden sevgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili dostlarım ve canım aileme;

Her zaman yanımda olan Şahan Ayvaz'a;

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu tez yakın zamanda kaybettiğim değerli meslektaşım, güler yüzlü direktörüm, Dr. Ecz. Ali Türkyılmaz'a ithaf edilmiştir.

Bu tez T.C. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (BAPKO; SAG-C-YLP-070317-0091).

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	xiv
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
GİRİŞ ve AMAÇ	3
1. GENEL BİLGİLER	5
1.1. Derinin Yapısı	5
1.1.1. Epidermis	6
1.1.2. Dermis	8
1.1.3. Hipodermis.....	9
1.2. Yaraların Değerlendirilmesi.....	9
1.2.1. Yara çeşitleri	9
1.2.2. Yara iyileşmesi.....	11
1.2.2.1. Hemostaz ve inflamasyon	12
1.2.2.2. Migrasyon	13
1.2.2.3. Proliferasyon	13
1.2.2.4. Matürasyon.....	13
1.2.3. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler	15
1.3. Yara İyileşmesinde Kullanılan Yara Örtüleri	15
1.3.1. Yara örtülerinin sınıflandırılması.....	16
1.3.1.1. Geleneksel yara örtüleri	16
1.3.1.2. Modern yara örtüleri	17

1.3.1.2.1. Düşük yapışma özellikli ya da yapışkan olmayan tabaka halindeki örtüler	17
1.3.1.2.2. Yarı-geçirgen adeziv film örtüler	17
1.3.1.2.3. Hidrokolloid örtüler	18
1.3.1.2.4. Hidrofiber örtüler	19
1.3.1.2.5. Aljinat örtüler	19
1.3.1.2.6. Hidrojel örtüler	20
1.3.1.2.7. Köpük örtüler	21
1.3.1.2.8. Larva örtü ve koku giderici örtüler	22
1.3.1.2.9. Biyolojik örtüler	23
1.3.1.2.10. Yara örtülerinde yeni yaklaşımlar	25
1.3.2. Yara örtüsü seçimi	27
1.3.3. Etken madde içeren yara örtüleri	29
1.4. Kollajen Hakkında Genel Bilgiler	30
1.4.1. Kollajenin yapısı	30
1.4.2. Kollajenin eczacılıkta kullanım alanları	32
1.4.3. Kollajenin ticari preparatları	33
1.5. Kitozan Hakkında Genel Bilgiler	33
1.5.1. Kitozanın yapısı ve fiziksel özellikleri	34
1.5.2. Kitozanın eczacılıkta kullanım alanları	35
1.5.3. Kitozanın ticari preparatlarda kullanımı	37
1.6. Allantoin Hakkında Genel Bilgiler	37
1.6.1. Allantoinin yapısı ve fiziksel özellikleri	38
1.6.2. Allantoinin farmakolojik özellikleri	38
1.6.3. Allantoinin ticari preparatlarda kullanımı	39
1.7.1. Lidokain HCl'nin yapısı ve fiziksel özellikleri	40
1.7.2. Lidokain HCl'nin farmakolojik özellikleri	40
1.7.3. Lidokain HCl'nin ticari preparatlarda kullanımı	42
1.8. Kollajen, Kitozan, Allantoin ve Lidokain HCl'nin Yara Örtülerinde Kullanılmaları	42
2. GEREÇ VE YÖNTEM	46
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler	46

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	46
2.1.2. Kullanılan araç ve gereçler.....	47
2.2. Yöntem ve Deneyler	48
2.2.1. Etken maddelerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi.....	48
2.2.1.1. Allantoinin çözünürlüğünün incelenmesi	48
2.2.1.2. Allantoinin erime noktasının tayini.....	49
2.2.1.3. Allantoinin kurutma kaybı tayini	49
2.2.1.4. Allantoinin infrared (IR) spektrumunun incelenmesi	49
2.2.1.5. Lidokain HCl'in çözünürlüğünün incelenmesi	49
2.2.1.6. Lidokain HCl'in erime noktasının tayini	49
2.2.1.7. Lidokain'in su içeriğinin tayini.....	50
2.2.1.8. Lidokain HCl'in infrared (IR) spektrumunun incelenmesi.....	50
2.2.2. Polimerlerin özelliklerinin belirlenmesi.....	50
2.2.2.1 Kitozanın infrared (IR) spektrumunun incelenmesi.....	50
2.2.2.2. Kollajenin infrared (IR) spektrumunun incelenmesi.....	50
2.2.3. Formülasyon bileşenleri arası geçimlilik çalışması	50
2.2.3.1. Etken maddeler arası geçimliliğin DSC ile değerlendirilmesi	50
2.2.3.2. Etken maddeler arası geçimliliğin FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi	51
2.2.3.3. Etken maddeler arası geçimliliğin TAM-IV mikrokaleorimetre ile değerlendirilmesi.....	51
2.2.3.4. Polimerler ve etken maddeler arası geçimliliğin FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi.....	51
2.2.4. Formülasyon çalışmaları	51
2.2.4.1. Önformülasyon çalışmaları	51
2.2.4.2. Formülasyon çalışmaları	56
2.2.4.2.1. Formülasyona etken maddelerin yüklenmesi.....	58
2.2.5. Formülasyonun karakterizasyonu için yapılan çalışmalar	60
2.2.5.1. Etken madde yüklenmemiş skafoldların karakterizasyonu.....	60
2.2.5.1.1. Skafoldların kalınlıklarının tayini	60
2.2.5.1.2. Skafoldların FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi	60
2.2.5.1.3. Skafoldların fiziksel görünümünün optik mikroskop ile değerlendirilmesi	60

2.2.5.1.4. Skafoldların atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterizasyonu	60
2.2.5.1.5. Skafoldların şişme özelliklerinin değerlendirilmesi.....	61
2.2.5.1.6. Skafoldların hidrolitik degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesi.....	61
2.2.5.1.7. Skafoldların <i>in-vitro</i> kollajenaz degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesi.....	61
2.2.5.2. Etken madde yüklenmiş skafoldların karakterizasyonu.....	62
2.2.5.2.1. Skafoldların FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi	62
2.2.5.2.2. Skafoldlara ilaç yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi.....	62
2.2.5.2.3. Analitik yöntem validasyonu	63
2.2.5.2.3.1. Spesifiklik	64
2.2.5.2.3.1.1. Pik tanımlaması, blank ve plasebo etkisi	64
2.2.5.2.3.1.2. Taşınma etkisi	64
2.2.5.2.3.2. Sistem uygunluk.....	64
2.2.5.2.3.3. Tespit limiti (LOD, Limit of detection)	64
2.2.5.2.3.4. Hesaplanabilirlik limiti (LOQ, Limit of quantitation)	65
2.2.5.2.3.5. Doğrusallık.....	65
2.2.5.2.3.6. Uygulama aralığı.....	67
2.2.5.2.3.7. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik	67
2.2.5.2.3.8. Kesinlik	68
2.2.5.2.3.8.1. Sistem kesinliği (tekrar edilebilirlik)	68
2.2.5.2.3.8.2. Yöntem kesinliği (tekrar elde edilebilirlik).....	68
2.2.5.2.3.9. Sağlamlık	68
2.2.5.2.3.9.1. Çözelti stabilitesi.....	68
2.2.5.2.4. Skafoldların etken madde salım özelliklerinin değerlendirilmesi.....	69
2.2.5.2.5. Skafoldların fiziksel görünümünün optik mikroskop ile değerlendirilmesi	69
2.2.5.2.6. Skafoldların atomik kuvvet mikroskobu ile karakterizasyonu	69
2.2.6. Stabilite çalışması.....	70
2.2.7. Hücre kültürü çalışmaları.....	70
2.2.7.1. Hücre kültürü	70
2.2.7.2. MTT analizi.....	70
3. BULGULAR.....	72

3.1. Etken Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular	72
3.1.1. Allantoininin çözünürlük tayini	72
3.1.2. Allantoinin erime noktası tayini	72
3.1.3. Allantoinin kurutma kaybı tayini	72
3.1.4. Allantoinin FT-IR spektrumunun incelenmesi	72
3.1.5. Lidokain HCl'in çözünürlüğünün incelenmesi	73
3.1.6. Lidokain HCl'in erime noktasının tayini	74
3.1.7. Lidokain HCl'in su içeriğinin tayini	74
3.1.8. Lidokain HCl'in FT-IR spektrumunun incelenmesi	74
3.2. Polimerlerin Özelliklerinin Belirlenmesi	75
3.2.1. Kitozanın FT-IR spektrumunun incelenmesi	75
3.2.2. Kollajenin FT-IR spektrumunun incelenmesi	76
3.3. Formülasyon Bileşenleri Arası Geçimlilik Çalışması Bulguları	77
3.3.1. Etken maddeler arası geçimliliğin DSC ile değerlendirilmesi	77
3.3.2. Etken maddeler arası geçimliliğin FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi	78
3.3.3. Etken maddeler arası geçimliliğin TAM-IV mikrokaloimetre ile değerlendirilmesi	79
3.3.4. Polimerler ve etken maddeler arası geçimliliğin FT-IR ile değerlendirilmesi	80
3.4. Formülasyon Hazırlanmasına Ait Bulgular	82
3.4.1. Ön formülasyon hazırlanmasına ait bulgular	82
3.4.2. Formülasyon hazırlanmasına ait bulgular	85
3.4.2.1. Formülasyona etken maddelerin yüklenmesi	85
3.5. Formülasyonun Karakterizasyon Çalışmalarına ait Bulgular	86
3.5.1. Etken madde yüklenmemiş skafoldların karakterizasyonu	86
3.5.1.1. Skafoldların kalınlıklarının değerlendirilmesi	86
3.5.1.2. Skafoldların FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi	86
3.5.1.3. Skafoldların fiziksel görünümünün optik mikroskop ile değerlendirilmesi	87
3.5.1.4. Skafoldların AFM ile karakterizasyonu	90
3.5.1.5. Skafoldların şişme özelliklerinin değerlendirilmesi	94
3.5.1.5. Skafoldların hidrolitik degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesi	95
3.5.1.6. Skafoldların <i>in-vitro</i> kollajenaz degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesi	97
3.5.2. Etken madde yüklenmiş skafoldların karakterizasyonu	99

3.5.2.1. Skafoldların FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi	99
3.5.2.2. Skafoldlara ilaç yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi	100
3.5.2.3. Analitik yöntem validasyonu	101
3.5.2.3.1. Spesifiklik	101
3.5.2.3.1.1. Pik tanımlaması, blank ve plasebo etkisi	101
3.5.2.3.1.2. Taşınma etkisi	103
3.5.2.3.2. Sistem uygunluk.....	104
3.5.2.3.3. Tespit limiti	104
3.5.2.3.4. Hesaplanabilirlik limiti	105
3.5.2.3.5. Doğrusallık.....	105
3.5.2.3.6. Uygulama aralığı.....	107
3.5.2.3.7. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik	108
3.5.2.3.8. Kesinlik	110
3.5.2.3.8.1. Sistem kesinliği (tekrar edilebilirlik)	110
3.5.2.3.8.2. Yöntem kesinliği (tekrar elde edilebilirlik).....	111
3.5.2.3.9. Sağlamlık	112
3.5.2.3.9.1. zelti stabilitesi.....	112
3.5.2.4. Skafoldların etken madde salım özelliklerinin değerlendirilmesi.....	112
3.5.2.5. Skafoldların fiziksel görünümünün optik mikroskop ile değerlendirilmesi	115
3.5.2.6 Skafoldların AFM ile karakterizasyonu	117
3.6. Stabilite alışması.....	120
3.7. Hücre Kültürü alışmaları	120
4. TARTIşMA VE SONUÇ	122
5. KAYNAKÇA	134
6. ZGEMİş	151

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Görünümlerine göre yaraların sınıflandırılması.....	11
Tablo 2. Kitozan içeren yara örtülerinin etkili oldukları bakteriler.....	43
Tablo 3. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonları gösteren tablo	54
Tablo 4. Etken madde yüklenmemiş formülasyonlar	57
Tablo 5. Etken madde yüklenmiş formülasyon tablosu	59
Tablo 6. Allantoin Hidroklorür çözünürlük değerleri	72
Tablo 7. Lidokain HCl çözünürlük değerleri	73
Tablo 8. Skafoldların kalınlık değerleri	86
Tablo 9. Skafold şişme yüzde değişim değerleri.....	94
Tablo 10. Skafold hidrolitik degradasyon değerleri	96
Tablo 11. Skafold <i>in-vitro</i> kollajenaz degradasyon değerleri	98
Tablo 12. Formülasyon çalışmalarında elde edilen skafold formülasyonlarına ait allantoin miktar tayini ve işlem etkinliği	101
Tablo 13. Formülasyon çalışmalarında elde edilen skafold formülasyonlarına ait lidokain HCl miktar tayini ve işlem etkinliği.....	101
Tablo 14. Pik Tanımlaması, Blank ve Plasebo Etkisi Testi Sonuçları	102
Tablo 15. Taşınma etkisi sonuçları.....	104
Tablo 16. Tespit limiti değerlendirmesi	105
Tablo 17. Hesaplanabilirlik limiti değerlendirmesi.....	105
Tablo 18. Analitik yöntem validasyonu allantoin doğrusallık sonuçları.....	106
Tablo 19. Analitik yöntem validasyonu lidokain HCl doğrusallık sonuçları	106
Tablo 20. Uygulama aralığı sonuçları	108
Tablo 21. Analitik yöntem validasyonu allantoin geri kazanım sonuçları	109
Tablo 22. Analitik yöntem validasyonu lidokain HCl geri kazanım sonuçları	110

Tablo 23. Sistem kesinliği değerleri.....	111
Tablo 24. Analitik Yöntem Validasyonu Yöntem Kesinlik Sonuçları.....	112
Tablo 25. Allantoin salım çalışması sonuçları	113
Tablo 26. Lidokain HCl salım çalışması sonuçları	113
Tablo 27. Skafoldların salım modellerine göre değerlendirilmesiyle elde edilen R ² değerleri.....	115
Tablo 28. F11-4 numaralı formülasyon için stabilite sonuçları (miktar tayini çalışması).....	120

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Derinin histolojik yapısı	5
Şekil 2. Epiderminin tabakaları	8
Şekil 3. Yara iyileşme sürecinin aşamaları	14
Şekil 4. Aljinat yapısı için iyonik çapraz bağlanma reaksiyonu	20
Şekil 5. Yara sınıfına uygun olarak yara örtüsü seçimi	28
Şekil 6. Kollajenin yapısı	31
Şekil 7. Kollajenin fibriler yapısı ve organizasyonu	32
Şekil 8. Kitozanın elde edilmesi	34
Şekil 9. Kitozanın kimyasal yapısı	35
Şekil 10. Kitozanın yara iyileşmesinde avantajları	37
Şekil 11. Allantoinin kimyasal yapısı	38
Şekil 12. Lidokain HCl'nin kimyasal yapısı	40
Şekil 13. Allantoinin FT-IR spektrumu	73
Şekil 14. Lidokain HCl FT-IR spektrumu	75
Şekil 15. Kitozanın FT-IR spektrumu	76
Şekil 16. Kollajenin FT-IR spektrumu	77
Şekil 17. Allantoin, Lidokain HCl, Allantoin-Lidokain HCl (1:1) karşılaştırmalı DSC termogramı	78
Şekil 18. Allantoin, Lidokain HCl, Allantoin-Lidokain HCl (1:1) karşılaştırmalı FT-IR spektrumu	79
Şekil 19. Allantoin ve lidokain HCl TAM-IV grafikleri	79
Şekil 20. Allantoin-lidokain HCl karışımı TAM-IV grafiği (549 nW/g ısı akışı)	80
Şekil 21. Kollajen-Kitozan (1:1) FT-IR spektrumu	81
Şekil 22. Kollajen-kitozan-allantoin-lidokain HCl toz karışımı FT-IR spektrumu ...	81

Şekil 23. Etken madde içermeyen skafold formülasyonlarının FT-IR spektrumları .	87
Şekil 24. F1, F5 ve F6 numaralı formülasyonların optik mikroskop görüntüsü.....	88
Şekil 25. F6-5 numaralı formülasyonun farklı bölgelerinden alınan optik mikroskop görüntüleri	89
Şekil 26. F10-1, F10-2, F10-3, F10-4 ve F10-5 numaralı formülasyonların optik mikroskop görüntüsü.....	89
Şekil 27. F10-1 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)	91
Şekil 28. F10-2 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)	91
Şekil 29. F10-3 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)	92
Şekil 30. F10-4 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)	92
Şekil 31. F10-5 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)	93
Şekil 32. Skafold şişmesine bağlı olarak ağırlıkça yüzde değişim grafiği.	95
Şekil 33. Skafold hidrolitik degradasyon yüzde değişim grafiği.....	97
Şekil 34. Skafold enzimatik degradasyon yüzde değişim grafiği	99
Şekil 35. Etken madde içeren skafold formülasyonlarının FT-IR spektrumları.....	100
Şekil 36. Allantoin test piki safsızlık kromatogramı	102
Şekil 37. Lidokain HCl test piki safsızlık kromatogramı	103
Şekil 38. Test çözeltisi kromatogramı (allantoin ve lidokain HCl pikleri).....	103
Şekil 39. Analitik yöntem validasyonu allantoin doğrusallık grafiği	107
Şekil 40. Analitik yöntem validasyonu lidokain HCl doğrusallık grafiği	107
Şekil 41. Allantoin salım grafiği.....	114
Şekil 42. Lidokain HCl salım grafiği.....	114
Şekil 43. F11-1, F11-2, F11-3 ve F11-4 numaralı formülasyonların optik mikroskop görüntüsü.....	116

Şekil 44. F11-1 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)	118
Şekil 45. F11-2 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)	118
Şekil 46. F11-3 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)	119
Şekil 47. F11-4 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)	119
Şekil 48. Etken madde yüklü olan ve olmayan hidrojel ürünlerinin 24 saat (A) ve 48 saat (B) inkübasyon süresi sonundaki MKH hücreleri üzerindeki hücre canlılığı sonuçları.	121

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Kollajen çözeltisi için homojenizatör kullanımı. Homojenizatör kullanımı sonrası 4 °C'de karıştırılmış çözelti ile elde edilen film (A) ve köpük içeren çözelti ile elde edilen film (B). 84

Resim 2. Kitozanın pH 4,0, 6,0 ve 7,4'de nötralizasyonu ile hazırlanan skafoldların görünümü 85

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LOD	Tespit Limiti
LOQ	Hesaplanabilirlik Limiti
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
MTT	3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
pH	Çözeltinin asitlik/bazlık derecesi – Hidrojen gücü
SS	Standart sapma
TAM-IV	Termal Aktivite Monitör Mikrok kalorimetre
UV	Mor ötesi

Allantoin yüklü kitozan/kollajen skafoldların hazırlanması ve karakterizasyonu

Öğrencinin Adı: Gizem Karaca

Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gökçen Yaşayan

Anabilim Dalı: Farmasötik Teknoloji

ÖZET

Amaç: Bu çalışma kapsamında yara iyileşmesi için allantoin yüklü kollajen, kitozan ve kollajen/kitozan karışımları ile yeni yara örtüleri hazırlanmıştır. Lokal anestezi etkisi düşünülerek formülasyonlara lidokain hidroklorür (HCl) de eklenmiştir. Hazırlanan formülasyonlar karakterize edilmiş ve hücre kültürü çalışmaları ile sitotoksisiteleri değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Allantoin etken maddesi içeren ve lidokain HCl ile desteklenmiş kitozan-kollajen skafoldlar, 0,5 M asetik asit içinde 1 M sodyum hidroksit ile nötrale edilmiş bir polimer çözeltisi hazırlanmasıyla oluşturulmuştur. Skafold formülasyonları fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FT-IR) spektrometre, optik mikroskop ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile incelenmiştir. Bunların yanında skafoldlar şişme analizi, *in-vitro* ve enzimatik degradasyon çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Geçimlilik çalışmalarında mikrokalorimetre, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve FT-IR spektrometre uygulanmıştır. Skafold formülasyonlarının stabilite ve *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre sitotoksitesi, mezenkimal kök hücreleri kullanılarak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) yöntemiyle belirlenmiştir.

Bulgular: *In-vitro* salım çalışmaları, skafoldların, yara iyileşmesi tedavisinde hızlı etkiye ihtiyaç duyan hastalar için yararlı olabileceğini göstermiştir. Etken maddeler arasında etkileşim/geçimsizlik tespit edilmemiştir.

Sonuçlar: Çalışmaların sonucunda allantoin yüklü ve lidokain HCl ile desteklenmiş kollajen-kitozan skafoldların yara iyileşmesi tedavisi için umut verici oldukları görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Skafold, allantoin, lidokain HCl, yara iyileşmesi, yara örtüsü

Preparation and characterization of allantoin loaded chitosan/collagen scaffolds

Student Name: Gizem Karaca

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gökçen Yaşayan

Department: Pharmaceutical Technology

ABSTRACT

The Aim: In this study, novel wound dressings were prepared with collagen, chitosan, and collagen/chitosan blends for wound healing. Lidocaine hydrochloride (HCl) was added to the formulations by considering its local anesthetic effect. The formulations were characterized, and their cytotoxicity was evaluated with the cell culture studies.

Materials and Methods: Chitosan-collagen scaffolds containing allantoin and supplemented with lidocaine HCl were prepared by constituting an acidic polymer solution in 0.5 M acetic acid, neutralized by 1 M sodium hydroxide. The scaffold formulations were examined by using an infrared spectroscopy, optical microscopy, and atomic force microscopy. Additionally, swelling analysis, *in-vitro* and enzymatic degradation experiments were carried with the scaffolds. Microcalorimeter, differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy were used for the compatibility studies. Stability, and *in-vitro* release studies of the scaffold formulations were conducted. Cell cytotoxicity studies were carried on mesenchymal stem cells by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.

Findings: *In-vitro* release studies showed that the scaffolds could be beneficial for patients that need an immediate effect in wound healing therapy. Interaction/incompatibility was not detected between active agents.

Results: The results of studies suggested allantoin loaded and lidocaine HCl supplemented collagen-chitosan scaffolds could be a promising candidate for wound healing therapy.

Key words: Scaffold, allantoin, lidocaine HCl, wound healing, wound dressing

GİRİŞ ve AMAÇ

Yapılan tez çalışmasının amacı, yara tedavisinde kullanılmak üzere allantoin yüklü ve lokal anestetik etkisinden dolayı lidokain HCl ile desteklenmiş kollajen-kitozan skafoldlar hazırlanması ve yara iyileşmesindeki etkinliklerinin hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmesidir.

Yara fiziksel ya da termal bir hasar sonucu derinin veya mukozanın epitel bütünlüğünün bozulması olarak tanımlanır (Boetang ve ark., 2008). Yaralar hastanın hayat kalitesini yüksek ölçüde düşüren, bazı durumlarda kronik, iyileşmeyen yaraların oluşmasına neden olan, eğer tedavi edilmezse uzuv kaybı (amputasyon) ve hatta ölüme neden olabilen bir durumdur. Yaşlı nüfusun artmasıyla ve obezite, diyabet gibi kronik hastalıkların çoğalmasıyla görülme sıklığı artmış ve yara tedavisi gittikçe önem kazanmıştır. Yapılan bir araştırmaya göre sadece kronik yaralar Amerika'da 5,7 milyon insanı etkilemektedir ve yara tedavisinin gideri için yıllık 20 milyar dolar harcanmaktadır (Järbrink ve ark., 2017; Sen ve ark., 2009).

Bu sebeplerle, yara örtüleri üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır ve yara ortamı nemini düzenleyen, eksuda fazlalığını emen, hava giriş çıkışını sağlayan, gerekliyse yaranın iyileşmesini hızlandıran ya da ağrıyı azaltan etken maddeleri içeren yara örtüleri geliştirilmeye başlanmıştır. Yara örtüsünün özelliklerinin, yaranın durumuna göre modifiye edilmesi amaçlanmaktadır (Vowden ve Vowden, 2017).

Bu çalışmada yukarıda belirtilen ihtiyaçtan yola çıkılması ile biyouyumlu ve yara iyileşme sürecini hızlandırıcı özellikte olmalarıyla öne çıkan polimerler olan kitozan ve kollajen kullanılarak formüle edilen skafoldlar hazırlanmıştır. (Rubina ve ark., 2016). Formülasyona, yara iyileşmesindeki etkinliğini anti-inflamatuvar cevabın regülasyonunu sağlaması ve fibroblast proliferasyonu ile ekstrasellüler matriks sentezini stimüle etmesi şeklinde gösteren allantoin (Araújo ve ark., 2010) ve yara oluşmasını takiben ortaya çıkan acı ve ağrı hissini azaltabilecek lokal anestetik bir etken madde olan lidokain HCl eklenerek yenilikçi bir preparat oluşturulması hedeflenmiştir (Gordh, 2010).

Çalışma kapsamında hazırlanan skafoldlara allantoin ve lidokain HCl yüklenmeden önce etken maddelerin fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Bu etken maddelerin geçimli olup olmadıklarının değerlendirilmesinde DSC, FT-IR Spektroskopisi ve TAM-IV mikrokaloimetre ile analizler yürütülmüştür. Sonrasında önformülasyon ve formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş olup, etken madde yüklenmemiş skafoldların karakterizasyonu aşamasına geçilmiştir. Bu kapsamda FT-IR çalışması, skafoldların fiziksel görünümünün optik mikroskop ile değerlendirilmesi, AFM ile karakterizasyon, skafoldların kalınlıklarının ve şişme özelliklerinin değerlendirilmesi, hidrolitik ve *in-vitro* degradasyon özelliklerinin incelenmesi gibi çalışmalar yapılmıştır. Etken maddelerin miktar tayini analizi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılmış olup bu iki etken madde için gerekli validasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Etken madde yüklenmiş skafoldlar yine FT-IR analizi ile değerlendirilmiş ve ek olarak $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / \%60$ bağıl nem $\pm \%5$ bağıl nem koşulunda 3 aylık stabilite çalışması yürütülmüştür.

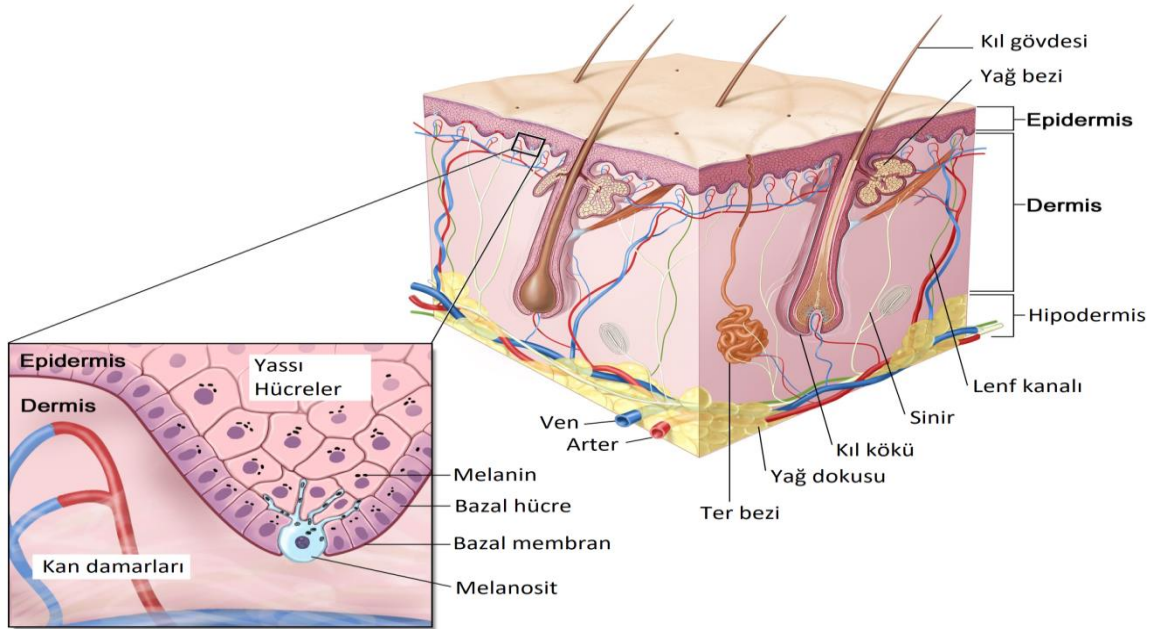
Allantoin ve lidokain HCl yüklenmiş kollajen-kitozan skafold formülasyonlarının etkinliğinin değerlendirilebilmesi için *in-vitro* salım çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları yürütülmüştür. Salım çalışmaları kapsamında allantoin ve lidokain HCl miktarının belirlenmesinde yine HPLC cihazı kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları için de mezenkimal kök hücreler (MKH) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ortamında inkübe edilerek MTT analizi yapılmıştır.

Çalışmamızda piyasada konvansiyonel dozaj formu bulunan allantoin ve lidokain HCl etken maddelerinin yeni bir ilaç taşıyıcı sistem olan skafoldlara yüklenmesi gerçekleştirilmiştir. Allantoin ve lidokain HCl etken maddelerinin geleneksel yara örtülerine ve dozaj formlarına kıyasla yenilikçi dozaj formuyla yara iyileşmesi için yapılan tedavilerde daha etkili olması beklenmektedir ve bu dozaj formlarına alternatif olarak sunulması planlanmaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Derinin Yapısı

Toplam yüzey alanı 1,8 - 2 m² ve ağırlığı 9 kg kadar olan vücudun en büyük organı deri birçok temel işleve sahiptir (Değim, 2007). Bunlardan en önemlisi ultraviyole ışınları, fiziksel ya da kimyasal hasara neden olabilecek ajanlar ve mikroorganizmalar gibi çevresel tehlikelere karşı bariyer oluşturmasıdır. Bunun yanında kendini yenileyebilme özelliğine sahip olan deri dehidratasyonu önler, ter salgısı ile atık ürünlerin atılmasını ve vücut ısısının ayarlanmasını sağlar (Değim, 2007; Maibach, 2014). Ek olarak vitamin D ve antimikrobiyal peptidlerin üretiminde hayati bir rol oynar (Albanna ve ark., 2016). Kimyasal maruziyet, ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturulması ve kozmetik preparatların formülasyonu gibi konular ile ilgili değerlendirmeler yapılırken deriden geçiş yollarının iyi bilinmesi gerekmektedir. Deri epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır (Maibach, 2014). Şekil 1'de derinin histolojik yapısı ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



Şekil 1. Derinin histolojik yapısı (Vandergriff ve Bergstresser, 2012)

1.1.1. Epidermis

Epidermis en dış tabakadır ve kalınlığı yer yer değişmek üzere 0,5 mm (göz kapağı) ile 1.5 mm (avuç içi ve ayak tabanı) arasındadır. Keratinositler, melanositler, Merkel ve Langerhans hücreleri olmak üzere dört ana hücre grubundan oluşmaktadır (Gilaberte ve ark., 2016). Keratinositler bu hücreler arasında en baskın hücrelerdir ve bazal tabakada sürekli yenilenirler. Olgunlaşan, başkalaşım geçiren hücreler yüzeye doğru itilirler ve yerlerini bu yeni hücrelere bırakırlar (Harvell ve ark., 1994). Kan damarı ve lenfatik sistem içermeyen epidermis, ağrının algılanabilmesi için bazı sinir sonlanmaları içermektedir (Değim, 2007).

Epidermis morfolojik görüntü ve hücre fonksiyonlarına göre beş ayrı tabakadan oluşmaktadır (Değim 2007). Bazal membrana en yakın olan katman stratum basale'dir. Germinatif katman olarak da kabul edilen bu tabakadaki hücreler yoğun metabolik aktivite ve yüksek çekirdek/sitoplazma oranı ile karakterizedir (Menon, 2002; Celleno ve Tamburi, 2009). Bu tabakadaki hücreler yuvarlak veya yumurta şeklinde olup dermise hemidesmozom denilen bağlantı birimleri, birbirlerine ise desmozom denilen birimler ile bağlıdırlar. Melanositler de yine bu katmanda bulunmaktadır (Değim 2007).

Stratum basale'den sonra stratum spinosum gelmektedir. Bu katman yoğun desmozom varlığı nedeniyle histolojik kesitlerde dikensi görünüme sahiptir. Spinoz katmanda tipik hücrelerin yanında 'Odland cisimciği' olarak ifade edilen lipit yüklü lamellar cisimcikler, keratinozomlar ve membran örtücü granüller görülmeye başlamakta ve granüler katmanda yoğunlaşmaktadır. Bu katmanda bazal hücrelere oranla belirgin hücrel keratin filamentleri (tonofibril) artışı bulunmaktadır. Keratin sağlam ve esnek bir koruyucu örtünün ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Menon, 2002; Wolff, 2009).

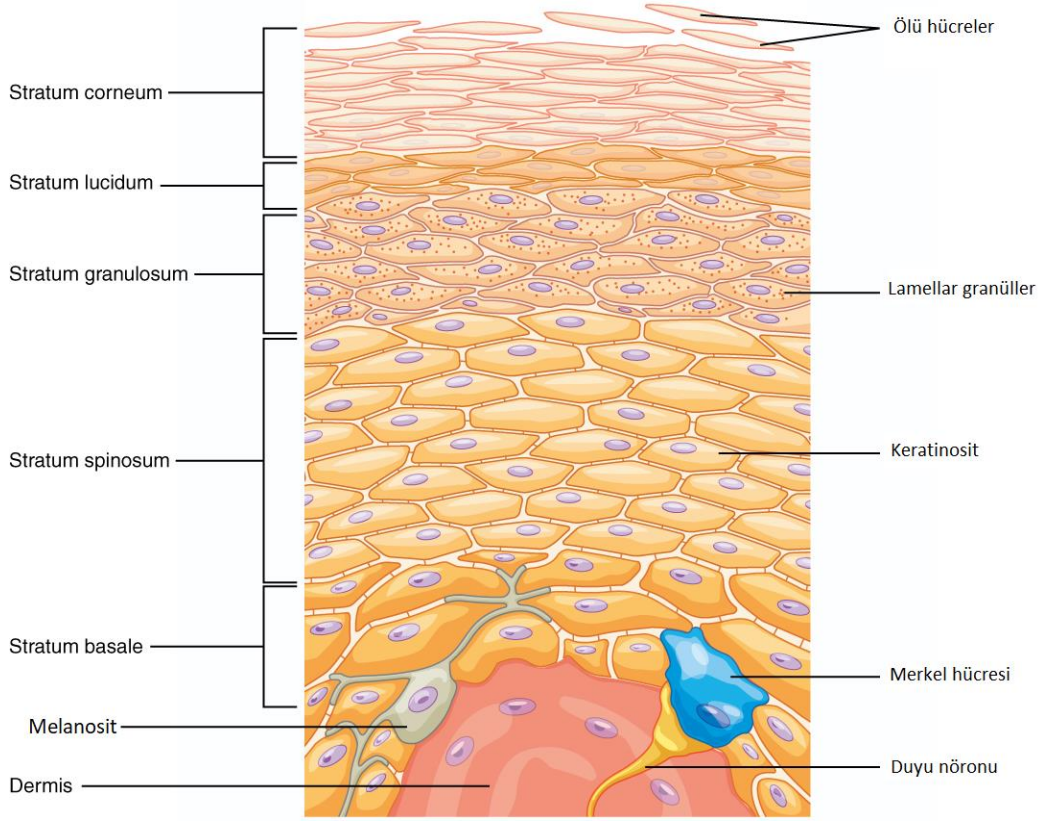
Aynı zamanda bazal katmandan sonra ağırlıklı olarak stratum spinosum tabakasında bulunan Langerhans hücreleri görülmeye başlar. Bu hücreler dendritik görünüme sahiptirler ve antijenlere karşı immün savunmada rol oynamaktadırlar (Celleno ve Tamburi 2009; Jaitley ve Saraswathi 2012; Albanna ve ark., 2016).

Yüzeğe doğru çıkıldıkça sitoplazmalarında keratohiyalin granülleri içeren, yassılaşıp çok sıralı geniş poligonal hücrelerden oluşan stratum granulosum görülmektedir. Bu katmandan sonra artık keratinositlerin işlevi ve morfolojisi değişmekte, poligonal şekilden daha şekilsiz yassı duruma geçerek bol miktarda hücre-içi keratin depolamaktadırlar (Celleno ve Tamburi, 2009). Çekirdek dağılması bu tabakada başlasa da hücrelerde çekirdek hala bulunmaktadır. Bu tabaka canlı epiderminin en dışı sınırı kabul edilmekte ve hidrofilik maddelerin difüzyonu için önemli bir bariyer olmadığı belirtilmektedir (Değim, 2007).

Bir sonraki katman stratum lucidum olup, çekirdek ve diğer stoplazmik organelleri olmayan yassı hücreler 'eleidin' adı verilen ve keratohiyalinin dönüşüm ürünü olarak kabul edilen özel homojen yapılar içermektedir. Bu tabakanın adı yüksek ışık kırıcı özelliğinden gelmektedir ve ayak tabanı, avuç içi gibi derinin sadece bazı kalın olduğu bölümlerinde bulunmaktadır (Celleno ve Tamburi, 2009; Shlivko ve ark., 2015).

Epiderminin en dış katmanına stratum corneum adı verilir. Bu katmandaki hücreler metabolik aktiviteden tamamen yoksundur. İnaktif bir tabaka olarak değerlendirilse de stratum corneum lipid, protein ve enzimlere ev sahipliği yapmaktadır. Lipid kompozisyonu seramid, serbest yağ asidi, sterol ve kolesterol esterlerinden meydana gelmektedir. 1970'li yılların ortalarında stratum corneum tabakası ile ilgili tuğla ve harç (bricks and mortar) modeli ortaya atılmıştır. Bu modelde protein faz (korneositler) lipid fazın (hücrelerarası lipid) içinde bulunmaktadır (Celleno ve Tamburi, 2009; Forslind ve Lindberg, 2004). Stratum corneum dışarıdan gelebilecek tehlikelere karşı bariyer oluşturulması konusunda en önemli görevi gören katmandır (Albanna ve ark., 2016).

Epiderminin tabakaları ve bu tabakalarda bulunan hücreler Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Epiderminin tabakaları (<http://library.open.oregonstate.edu/aandp/chapter/5-1-layers-of-the-skin/>, Erişim tarihi: 02 Haziran 2018)

1.1.2. Dermis

Dermis epiderminin altında yer almakta olup ondan 5-20 kat daha kalın bir fibröz yapıda bir tabakadır. Bu tabakada hücre sayısı azdır ve kollajen ihtiva etmektedir. Bu tabaka kan ve lenf damarlarını fiziksel olarak destekleyerek korur. Ayrıca bazı bezler, bağışıklık sistemi hücreleri ve sinir uçlarını barındırır (Cevc, 1996).

Bu tabaka, mast hücreleri ve makrofajlar ile immün cevabın ve inflamasyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte pilosebace bezler olarak ifade edilen saç folikülleri ile yağ bezleri, terlemeden sorumlu olan ekrin bezler ve apokrin bezler de bu tabakada bulunmaktadır. Vücudun kısımlarına göre boyutları ve yerleşim oranları değişen bu bezlerin deride oluşturdukları boşluklardan etkin maddelerin geçişi gerçekleşebilmektedir (Değim, 2007).

1.1.3. Hipodermis

Dermisin hemen altında ve kasların hemen üzerinde yer almakta olan hipodermis başlıca adipöz dokudan oluşmaktadır (Albanna ve ark., 2016). Üzerindeki katmanlara destek olmakta, ısı ve enerji yalıtımı görevi görmekte ve kollajen ile deriye esneklik sağlamaktadır (Maibach, 2014; Değim, 2007).

1.2. Yaraların Değerlendirilmesi

Yara; fiziksel-termal travmalar, cerrahi girişim ya da kişinin fizyolojik durumu gibi sebeplerle deride meydana gelmiş bozulmalar ya da doku kayıpları olarak tanımlanabilir. Dünya Sağlık Örgütü yaranın normal anatomik yapı ve fonksiyonun bozulması sonucu ortaya çıktığını bildirmiştir (Boetang ve ark, 2008).

Derinin tahrip olması ile ortaya çıkan yaralar; vücut sıvılarının kaybı, enfeksiyon, hipotermi, bağışıklık sisteminde olumsuz etkiler ve yara izleri ile birlikte vücudun görünümünde değişikliklere neden olabilir. Tüm bunlar önemli olmakla birlikte vücut yüzeyinin %70'ten fazlasının hasar gördüğü yaralanmalar ve yanık vakaları ölümle sonuçlanabilmektedir (Alemdaroğlu ve ark, 2006).

1.2.1. Yara çeşitleri

İyileşme süreci göz önünde bulundurulduğunda yaralar temelde akut ve kronik olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Akut yaralar genel olarak 8-12 hafta içinde minimum düzeyde iz bırakarak tamamen iyileşen yaralar olarak tanımlanabilir. Akut yaralar genellikle deri yüzeyinin sert bir yüzeye maruz kalması gibi mekanik kökenlidir. Kronik yaraların ise iyileşme süresi 12 haftadan fazladır. Vücudun hareket etmesi ile dokunun stabil durumunu koruyamaması ya da diabetes mellitus, kalıcı enfeksiyonlar, yetersiz ilk yardım uygulamaları gibi hasta kaynaklı nedenler ile iyileşme süreci uzayabilmektedir. Dekübit ülser ve bacak ülserleri de kronik yaraya dahil edilebilir (Boetang ve ark., 2008).

Yaralar buna ek olarak etkiledikleri derideki alan ve tabaka sayısına göre de sınıflandırılırlar. Eğer yara sadece epidermiste meydana gelmişse yüzeysel yara, epidermin yanında daha derin tabakalarda; kıl foliküllerinin, ter bezlerinin kan damarlarının bulunduğu kısımlara ulaşmışsa kısmi kalınlıkta yara, hipodermisin

altındaki dokulara ulaşmışsa tam kalınlıkta yara olarak ifade edilir (Boetang ve ark, 2008).

Cerrahi açıdan bakıldığında yaralar dört temel sınıfa ayrılırlar. Cerrahi ortamda meydana getirilmiş steril yaralar, temiz yaralar olarak ifade edilir ve antibiyotik kullanımına gerek yoktur. Temiz ve kontamine yaralar; başlangıçta temiz olan yaranın sindirim, solunum ve ürogenital sistemlerin açılması sonucu kontamine olması ile oluşur. Kontamine yaralar; cerrahi işlem öncesinde mikroorganizmalar ile kontamine olmuş yaralardır. Açık yaralanmalar, kaza yaraları bu tip yaralanmaya örnektir. Enfeksiyon gelişmemiştir. Kirli ve enfekte yaralar ise cerrahi işlem öncesinde enfekte olmuş yaraları ifade eder (Mangram ve ark., 1999).

Yaranın görünümüne göre yapılmış bir sınıflandırma Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Görünümlerine göre yaraların sınıflandırılması (Eccleston, 2007).

Yara tipi	Görünüm	Yara iyileşmesi evresi
Nekrotik	Siyah ya da koyu yeşil, kuru tara, bası yarası ile karakterize	Uygun koşullarda yara sonucunda oluşmuş ölü doku sağlıklı dokudan kolayca ayrılır. Bu otolizin ve makrofajlara ilave olarak proteolitik enzimlerin etkisiyle oluşur. Ancak yara alanının kuru olması bunu engeller.
Kabuklu	Nemli, gevşek ve iplik iplik doku, sarı renk ile karakterize	İnflamasyon evresi boyunca çok fazla eksuda oluşmasıyla ilişkilidir.
Granüle	Kırmızı ya da koyu pembe renkte, eksudalı, granüle doku	Proliferatif fazla ilişkilidir.
Epitelizasyon gerçekleşen	Epidermisin yeniden oluşmasıyla birlikte pembe renk	Migrasyon ve proliferasyon evreleriyle ilişkilidir.
Enfekte ve kötü kokulu	Kırmızı renkte iltihaplı doku, anaerobik bakterilerin oluşturduğu kötü koku ile karakterize	İnflamasyon cevap, kollajen sentezi ve epitelizasyon ile ilgilidir. Oluşan iltihap yara iyileşmesini geciktirir.

1.2.2. Yara iyileşmesi

Yara iyileşmesi genel olarak büyüme ve doku yenilenmesi ile ilişkili özel bir biyolojik süreci ifade etmektedir. Bu süreç, kaybolan dokunun onarılması ve deri

bütünlüğünün tekrar sağlanmasını kapsayan, birbiriyle bağlantılı fazlar halinde ilerlemektedir (Boetang ve ark, 2008). Her faz yaranın meydana gelmesini takiben salgılanan faktörler ile düzenlenen ve yönetilen hücresel ve moleküler olaylar ile karakterizedir. Bu bileşenler ve yara iyileşmesi aşamaları Şekil 3'te özetlenmektedir (Sun ve ark., 2014).

Yara kapanması ve iyileşmesi doku kaybına göre değişkenlik göstererek cerrahide primer, sekonder ve tersiyer iyileşme olarak incelenmektedir. Primer iyileşmede doku kaybı en az seviyededir. Eğer enfeksiyon ya da nekroz yoksa doku minimum granülasyon ile iyileşmektedir. Sekonder iyileşmede doku kaybı ve epidermal bariyer hasar gördüğünden kontaminasyon riski daha fazladır. Kesik doku kenarları birbirine uzaktır ve birleşip iyileşmesi daha çok vakit almaktadır. Bu iyileşmede granülasyon da fazladır. Tersiyer iyileşmede ise yaraya dikiş atılması gibi medikal bir müdahale için geç kalınmıştır. Yara bölgesinde kan akımı zayıflamış ve enfeksiyon gelişmiştir. Yaranın en uzun sürede kapandığı iyileşme tipidir (DeLaune ve ark., 2016).

1.2.2.1. Hemostaz ve inflamasyon

Derinin yaralanmasıyla meydana gelen kanamanın durdurulması için çoklu fizyolojik cevaplar gelişmeye başlar. Yaralanma bölgesindeki düz kas hücreleri damarların daralmasını indükler ve kan kaybını azaltırlar (Sun ve ark., 2014). Bununla birlikte trombositler (plateletler) ve pıhtılaşma faktörleri gibi eksuda bileşenlerinin aktive olduğu hemostaz aşaması başlamış olur. Bu aşamada fibrinojenin etkisiyle pıhtı oluşur ve çapraz fibrin ağları lökositler, keratinositler ve fibroblastlar dahil olmak üzere hücrelerin teması için bir iskele görevi gören hemostatik bir tıkaç meydana getirir. Sonrasında bu kısım kuruyarak yarayı koruyan ve destek olan bir kabuk halini alır. İnflamasyon aşaması ise hemostaz ile neredeyse eş zamanlı başlar, bu yaralanmanın oluşmasından itibaren bir kaç dakika ile 24 saat arasında bir sürede gerçekleşir ve üç gün devam edebilir. İnflamasyon aşaması hücresel ve vasküler cevabı kapsar. Bu aşamada nötrofiller yara bölgesine sızar, bakterileri öldürür ve hasar görmüş matris proteinlerini azaltırlar. Nötrofillerin aktive edilmesinde IL-1, TNF- α gibi sitokinler rol oynamaktadır (Gonzalez ve ark., 2016). 24 saat içinde makrofajlara dönüşen monositler de mikroorganizmaları yok

eder, nötrofilleri ve doku artıklarını ortadan kaldırır, damarlanma ve doku granülasyonu için uygun ortamı oluştururlar (Şekil 3) (Boetang ve ark., 2008; Sun ve ark., 2014).

1.2.2.2. Migrasyon

Bu aşama epitel hücrelerinin ve fibroblastların yarananma bölgesindeki hasarlı ya da yok olmuş doku ile yer değiştirmesini ifade eder. Bu hücreler kenarlardan başlayarak kabuğun altındaki yaranın üzerinde hızlıca yayılırlar. Aynı zamanda epitel kalınlaşma görülür (Boetang ve ark., 2008). Yara kenarlarındaki keratinositler, çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri migrasyonu etkilemekte ve bölgesel hücre farklılaşmasına neden olmaktadır (Gonzalez ve ark., 2016).

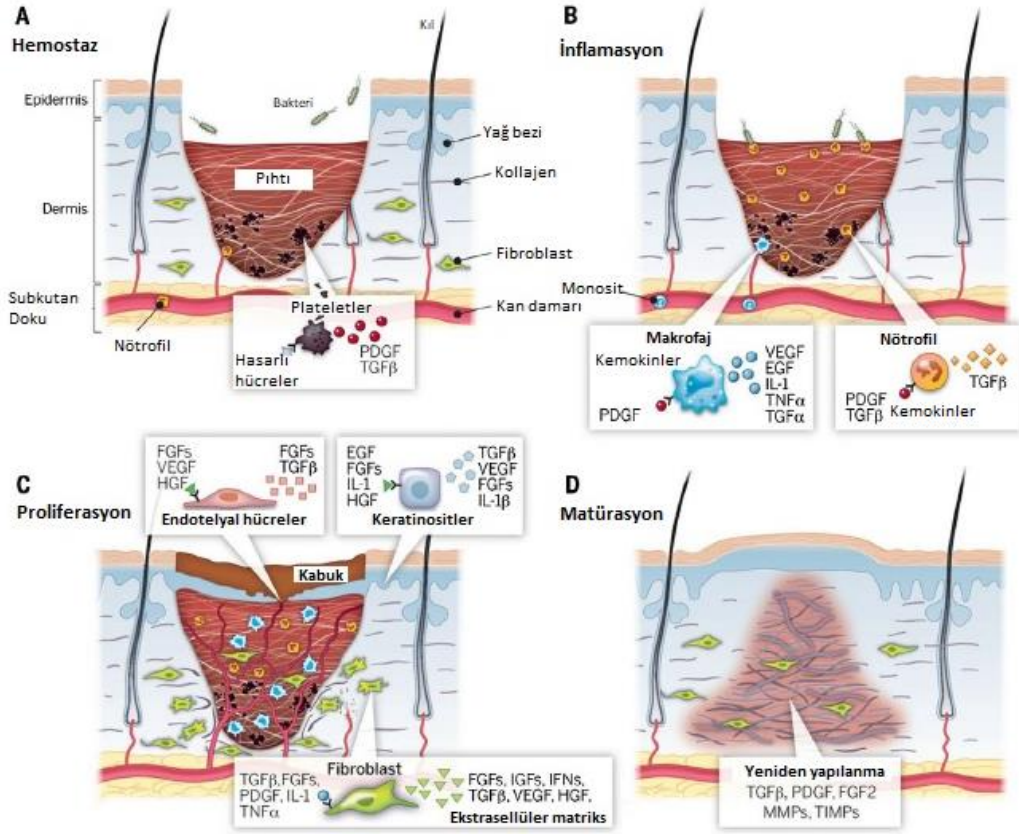
1.2.2.3. Proliferasyon

Proliferatif faz migrasyon ile eş zamanlı ya da hemen sonrasında meydana gelebilmekte, bu iki faz sadece proliferasyon başlığı altında da değerlendirilebilmektedir (Sun ve ark., 2014; Boetang ve ark., 2008). Bu aşamada fibroblastlar tarafından deriye esneklik veren kollajen sentezi gerçekleşir (Boetang ve ark., 2008). Hücre çoğalması ve matriks oluşumu büyüme faktörlerinin (platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), değişiklik yapan alfa büyüme etkeni (TGF- α) ve değişiklik yapan beta büyüme etkeni (TGF- β)) salgılanması ile uyarılır (Sun ve ark., 2014). Beşinci güne kadar kan damarları ve granülasyon dokusu oluşumu en üst seviyeye çıkar. Granülasyon dokusu pembe, yumuşak ve pürüzlü görüntüsü ile karakterizedir. Yaranın ve oluşan inflamasyonun şiddetine göre büyüklüğü değişir. İki haftaya kadar fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezi devam eder, zamanla kan damarları (anjiogenez ile oluşan kılcal damarlar) azalır ve ödem yok olur (Boetang ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2014).

1.2.2.4. Matürasyon

Bu aşamanın diğer adı remodülasyon evresidir. Hücresel granüler doku birkaç aydan iki seneye kadar değişen bir sürede hücresel olmayan bir kütleye dönüşür. Granülasyon dokusu azaldıkça bağ dokusu artar. Bu sürede yara izi son halini alır

(Boetang ve ark, 2008; Kumar ve ark., 2014). Yeniden yapılanma evresinde yara izini oluşturmak üzere büyüme faktörlerine ek olarak metalloproteinazlar görev alır ((matriks metalloproteinazlar (MMP) ve metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP)) (Bknz. Şekil 3) (Sun ve ark., 2014).



Şekil 3. Yara iyileşme sürecinin aşamaları, A. Hemostaz, B. İnflamasyon, C. Proliferasyon, D. Matürasyon. PDGF, trombosit kökenli büyüme faktörü; FGF, fibroblast büyüme faktörü; TGF, transforme edici büyüme faktörü; IL-1, interlökin-1; TNF, tümör nekroz faktörü; KGF, keratinosit büyüme faktörü; IGF, insüline benzer büyüme faktörü; IFN, interferon; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü; HGF, hepatosit büyüme faktörü; MMP, matriks metalloproteinaz; TIMP, metalloproteinaz doku inhibitörü (Sun ve ark., 2014).

Bu aşamaların başlatılması, sonlandırılması veya düzenlenmesi esnasında meydana gelmiş herhangi bir başarısızlık, patolojik yara iyileşmesi ile sonuçlanabilmektedir. Örnek olarak piyojenik granülom (granülasyon dokusunun fazla büyümesi), hipertrofik yaralar ve keloidler (fazla fibrotik cevap), kronik ülserler (uzamış inflamasyon evresi ve tekrar epitelizasyonda yetersizlik) verilebilmektedir (Sun ve ark., 2014).

1.2.3. Yara iyileşmesini etkileyen faktörler

Yara iyileşmesini etkileyen çok çeşitli bölgesel ve sistemik etmenler bulunmaktadır. Bölgesel etmenler; yara bölgesinde enfeksiyon, yetersiz kan dolaşımı, hipoksi, doku nekrozu, yabancı partiküllerin varlığı, tekrarlayan travmalar, yara bölgesinin hareketliliği yara bölgesinde kuruluk ve ödem şeklinde sıralanabilir. Sistemik etmenler ile ilgili olarak da beslenme yetersizliği, diyabet, kronik renal yetmezlik, immün bağışıklık sendromu gibi hastalıklar, hastanın yaşı, cinsiyeti ve genetik yapısı gibi durumlar sayılabilir (Boetang ve ark, 2008).

Bunların yanı sıra sigara, alkol ya da uyuşturucu madde kullanımı, kortikosteroidler, radyasyon terapileri, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar ve kanser ilaçları yara iyileşmesi sürecini etkileyebilmektedir (Sun ve ark., 2014).

1.3. Yara İyileşmesinde Kullanılan Yara Örtüleri

Yara örtüleri bitkisel preparat, hayvansal yağ ve bal gibi maddelerin kullanıldığı basit uygulamalardan, doku mühendisliğinin kullanıldığı yapı iskelelerine kadar yıllar içinde gelişme göstermiştir. Örneğin Afrika'da *Guiera senegalensis* bitkisi antibakteriyel etkisi ve şişme özelliğinden faydalanılmak üzere yara tedavisinden kullanılmıştır. *Commelina diffusa* otu ve *Spathodea campanulata* kabuğu da aynı amaçla uygulanmıştır. Ancak bu şekilde işlem görmemiş bitkilerin doğrudan kullanımı mikroorganizmalarla kontaminasyon bakımından riskli bir durum oluşturmakla birlikte içerdikleri stabilize edilemeyen farklı kimyasallar, istenmeyen etkiler elde edilmesine de neden olabilmektedir (Boetang ve ark., 2008). Yine bu kapsamda 1600'lü yıllara dayanan yağ emdirilmiş keten kumaşların örtücü olarak kullanıldığı yara örtüsü uygulamalarıyla karşılaşmak mümkündür (Dhivya ve ark., 2015). Tedavide hijyenin ve aseptik çalışmanın öneminin artmasıyla birlikte yara iyileştirme sürecinde kullanılan materyallerin kalitesi de artmıştır (Boetang ve ark., 2008).

Günümüzde ideal bir yara örtüsünden beklenen özellikler; yara yüzeyindeki nem oranını koruyabilmesi aynı zamanda fazla miktardaki eksudayı hapsedebilmesi, partikül ya da yara için toksik olabilecek bileşenleri içermeyen non-toksik ve non-alerjenik yapıda olması, yarayı iyileşme döneminde meydana gelebilecek

travmalardan koruyabilecek özellikte olması, zarar vermeyecek şekilde yaradan uzaklaştırılabilmesi, bakteri geçirmemesi, ısı yalıtımlı, gaz değişimine izin veren, kullanımı rahat, az değiştirme gerektiren, uygun maliyetli ve raf ömrü uzun bir preparat olması olarak sayılabilmektedir (Jones ve ark., 2006; Vowden ve Vowden, 2017).

1.3.1. Yara örtülerinin sınıflandırılması

Yara örtüleri yara iyileşmesindeki fonksiyona, üretiminde kullanılan materyale ya da yara örtünün fiziksel özelliğine göre sınıflandırılabilirler. Bunun yanında yarayla birebir temas eden birincil örtü, birincil örtüyü çevreleyen ikincil örtü ve ortasında absorban kısım etrafında da yapışkan kısım bulunan ada şeklindeki örtü tipini içeren bir sınıflandırma yapılmıştır. Ek olarak geleneksel örtüler, modern ve ileri teknik örtüler, doku replasman ürünleri ve yara iyileştirici araçları kapsayan da bir sınıflandırma mevcuttur. Bazı yara örtüleri birden fazla sınıfa dahil olabilmektedir (Boetang ve ark., 2008).

1. 3.1.1. Geleneksel yara örtüleri

Pamuklu sargı bezleri, sentetik bandaj ve gaz bezleri bunlar arasında sayılabilir. Topikal olarak uygulanan dozaj formlarından farklı olarak bu örtüler kuru ve yara bölgesine gerekli nemi sağlayamayacak durumdadır. Bunlar birincil, ikincil ya da spesifik bir amaca yönelik kullanılan örtülerdir (Boetang ve ark., 2008).

Bandajlar pamuk, yün ve selüloz gibi doğal materyallerden yapılabildikleri gibi poliamid türü sentetik materyaller kullanılarak da üretilebilirler. Gaz bezleri dokumayla ya da pamuk lifleri ile oluşturulur. Açık yaralarda, modern örtülere kıyasla daha az maliyetli olmalarından dolayı sık sık tercih edilir. Eksudayı ve diğer yaradan salgılanan vücut sıvılarını absorbe edebilme özelliğine sahiptirler ve sık sık değiştirilmeleri gerekmektedir. Yarayı kapatarak dışarı ile teması azaltsalar da gözenekli yapıları ile ancak kısmen bakteriyel koruma sağlanabilir (Lawrence, 1994). Eksudayı emdikleri ve ıslandıkları durumlarda bu koruyuculuğu kaybederler. Özellikle selülozun her durumda antimikrobiyal bir etken ile desteklenmeye ihtiyacı vardır (Naseri-Nosar ve Ziora, 2018). Ek olarak yarada kalıntı bırakarak malformasyon meydana getirebilirler, yaranın kurummasını takiben yaraya

yapışabildikleri için değiştirilme sırasında dokuya hasar verip, hasta uyuncunu olumsuz etkileyebilirler (Jones ve ark., 2006; Lawrence, 1994). Bir miktar parafin ile uygulanmaları değiştirilmelerinin kolaylaşmasını sağlar. Bunun yanında gazlı bezler yara üzerinde tıkaç görevi görürler, yara yüzeyindeki nemin uçuşuna izin veren yapıları yaranın kuru kalmasına neden olur. Temiz yaralara uygulanmaları tavsiye edilir (Boetang ve ark., 2008).

1.3.1.2. Modern yara örtüleri

Katı ve yarı-katı topikal ajanların yara yüzeyinde yeterince uzun süre kalamaması, geleneksel örtülerin yara için gerekli nemi sağlayamaması ve bakterilere karşı koruyuculuğun tam olarak elde edilememesi gibi nedenlerle, yara iyileşmesi için kullanılan geleneksel yöntemler yerini modern örtülere bırakmıştır (Boetang ve ark., 2008; Lawrence, 1994). Aşağıda açıklanan modern yara örtüleri, ağırlıklı olarak üretimlerinde kullanılan materyal göz önünde bulundurularak sınıflandırılmıştır.

1.3.1.2.1. Düşük yapışma özellikli ya da yapışkan olmayan tabaka halindeki örtüler

Bu tip örtüler doğrudan yara yatağına uygulanabilirler. Silikon ya da çok tabakalı-delikli plastik yapıdadırlar. Değiştirilmeleri esnasında hastaya sıkıntı vermezler dolayısıyla hassas yapıda cildi olan hastalar için uygundur. Absorban bir ürünle birlikte ikincil örtü olarak kullanılabilirler. En çok parmak ucu yaraları, tırnak çekim operasyonları ve negatif basınç terapisi (negatif basınç uygulaması ile yara iyileşmesinin hızlandırıldığı modern bir yara tedavisi yöntemi) esnasında tercih edilirler (Vowden ve Vowden, 2017; Jones ve ark., 2006). Bu tip yara örtülerine örnek olarak Mepitel[®], Mepilex[®] ve Biatain[®] Silicone verilebilir (<https://www.coloplast.co.uk/biatain-silicone-en-gb.aspx>, Erişim tarihi: 03 Haziran 2018; Jones ve ark., 2006).

1.3.1.2.2. Yarı-geçirgen adeziv film örtüler

Bu örtüler sıvılar ve bakteriler için geçirgen olmayıp hava ve su buharı için geçirgen özelliktedir. Bu özellikleri yaranın ideal nemlilikte kalmasını

sağlamaktadır. Yine şeffaf görünümlü olmaları yaranın iyileşme sürecinin takip edilmesine olanak sağlamaktadır (Jones ve ark., 2006).

Bu örtüler ilk olarak naylon türevlerinden yapılmıştır. Ancak su absorbe etme özellikleri yeterli bulunmamıştır. Daha sonra ticari bir ürün olan Opsite™, poliüretandan yapılmış ve hipoalerjenik akrilik asit türevleriyle kaplanmıştır. Ürün çok ince olması sonucu sadece yüzeysel yaralar için uygun bulunmuştur. Birincil örtü ya da ikincil örtü olarak değerlendirilebilirler (Vowden ve Vowden, 2017). Bu sınıfta değerlendirilebilecek diğer ticari filmler; Cutifilm™, Bioocclusive™ ve Tegaderm™ olarak sayılabilir (Boetang ve ark, 2008).

Yarı-geçirgen adezif filmlerin yaraya yapışabilmesi için kuru bir yüzey gereklidir. Bu yüzden nemli ya da eksudalı yaralar için uygun değildir. Daha çok ameliyat sonrası kontamine olmamış yaralar ve esnek yapılı olmaları sebebiyle eklemler için tercih edilmektedirler (Vowden ve Vowden, 2017; Jones ve ark., 2006).

1.3.1.2.3. Hidrokolloid örtüler

Hidrokolloid yara örtüleri koloidal materyaller ile elastomer gibi adezif materyallerin bileşimiyle oluşurlar. Jel yapıcı ajan olarak da karboksimetil selüloz, pektin ve jelatin içerebilirler. Ticari preparatlara örnek olarak; Granuflex™, Aquacel™, Comfeel™ ve Tegisorb™ verilebilir. Aljinatla kombine edilmiş preparatlar da mevcuttur. İnce film ya da tabaka halinde bulunabilirler. Bu örtüler genel olarak minör yanıklar, travmatik yaralar ve bası yaraları gibi hafif eksudalı yaralar için kullanılırlar. Yarayla temas ettikten sonra eksudayı içlerine hapsederler, fiziksel halleri jelleşir ve nem geçişine olanak sağlamaya başlar. Bununla birlikte yaradan çıkarılmaları acısız olduğu için pediatrik vakalarda kullanımları uygundur (Boetang ve ark, 2008). Oluşturdukları bariyer hastanın düş almak gibi günlük aktivitelerini aksatmamasına olanak tanır (Jones ve ark., 2006).

Hidrokolloid örtülerin enfeksiyonlu yaralarda ya da sık muayene gerektiren diyabet yaraları gibi yaralar için kullanılması tavsiye edilmez (Jones ve ark., 2006). Sakrum ya da topuk gibi örtünün sabit kalmasının zor olduğu durumlarda yapışma özelliğinden ötürü tercih edilirler. Bazı durumlarda ortaya çıkardıkları kötü koku enfeksiyonla ilgili değil, ürün hatası yüzündendir (Vowden ve Vowden, 2017).

1.3.1.2.4. Hidrofiber örtüler

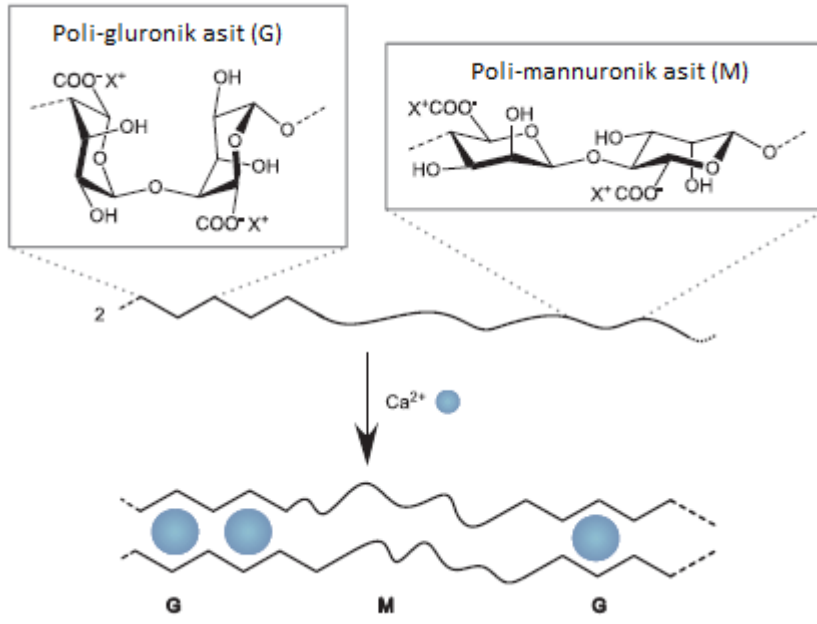
Hidrokolloid örtülere daha fazla absorplama özelliği kazandırılarak oluşturulmuş yara örtüleridir. Sodyum karboksimetil selüloz içerirler. Ağırlıklarının 25 katı kadar su çekme özelliğine sahiptirler. Dikey fitilleme ile oluşturulan dokusunun cilt maserasyonunu azaltan bir etkisi vardır. (Vowden ve Vowden, 2017).

Aqucel® ve Versiva® hidrofiber örtülere örnek olarak gösterilebilir (Jones ve ark., 2006).

1.3.1.2.5. Aljinat örtüler

Aljinat örtüler, mannuronik asit ve gluronik asidin glikozid bağı ile bağlanması sonucu meydana gelen bir heteropolisakkarit olan aljinik asidin kalsiyum ve sodyum tuzlarından üretilirler (Bknz. Şekil 4) (Koehler ve ark., 2018). Bu örtüler esnek liflerden ya da dondurularak kurutulmuş poröz tabakalardan oluşur. Kalsiyum iyonu içeren örtüler, yara örtüsündeki kalsiyum ile kandaki sodyumun iyon değişimi sonucu hemostatik etki göstererek kanamanın hafiflemesine yardımcı olabilmektedir. Yarayla temas ettiklerinde yaraya yapışır, içerdiği iyon aracılığı ile yara üzerinde koruyucu bir tabaka oluşturur ve bakteriyel kontaminasyonu en aza indirirler. Mekanik stabiliteleri yüksektir. Ticari preparatlara örnek olarak; Sorbsan™, Kaltostat™, Sorbsan™, Tegagen™ ve Comfeel Plus™ verilebilir (Boetang ve ark, 2008; Vowden ve Vowden, 2017; Kamoun ve ark.,2017).

Aljinat örtüler ağırlıklarının 20 katı kadar sıvıyı absorplama özelliğine sahiptirler bu yüzden çok fazla eksudalı yaralar ve cerrahi yaralar için tercih edilmelidirler. Kuru ve nekrotik doku ile kaplı yaralarda kullanılmamaları gerekir. Antiseptik su ile acısız ve kolayca uzaklaştırılabilirler (Boetang ve ark, 2008; Vowden ve Vowden, 2017). Günlük olarak değiştirilmeleri gerekmektedir (Jones ve ark., 2006).



Şekil 4. Aljinat yapısı için iyonik çapraz bağlanma reaksiyonu (Koehler ve ark., 2018).

1.3.1.2.6. Hidrojel örtüler

Hidrojel yara örtüleri polimetakrilat, polivinilpirolidon gibi sentetik polimer ya da kitozan, kollajen gibi doğal polimerlerden meydana gelen, suda çözünmeyen ve şişebilen özellikteki örtülerdir. Tabakaların hazırlanışında polimerik bileşenlerin çapraz bağlanması su hapsedebilmeleri için önemlidir. Hidrojel yaraya jel formunda uygulandığında, ikinci bir örtüye ihtiyaç duyulur. Ancak hidrojeller örtü olarak kullanıldığında ikincil örtü görevini de üstlenirler. Ticari preparatlara örnek olarak; Nu-gel™ ve Purilon™ verilebilir (Boetang ve ark, 2008; Koehler ve ark., 2018).

Bu örtülerin yüzde 70-80 kadarı su olduğu için genelde kuru yaralarda rehidrasyon ajanı olarak kullanılırlar. Ayrıca orta derece eksuda içeren yaralar için ve yanık tedavisinde kullanılırlar. Esnek yapıları sayesinde yaraya göre boyutları ayarlanabilmektedir (Boetang ve ark, 2008). Yine su ve gliserin tabanlı ürünler olmaları sebebiyle yarı-şeffaf ya da şeffaftırlar ve iyileşme süresince yaranın durumunun takip edilmesine olanak sağlarlar (Kurtoğlu ve Karataş, 2009; Kamoun ve ark.,2017; Vowden ve Vowden, 2017).

Yara iyileştirmede kullanılabilecek bir örtü için ideal özelliklere sahiptirler. Kuru, kabuklu ve nekrotik yaralara uygulandıklarında yaranın ideal nemlilikte

kalmasına yardımcı olurlar. Biyolojik dokularla etkileşime girmezler ve metabolitlerin geçişine izin verirler. Nemli bir iyileşme ortamı sağladıkları için yara yüzeyi serin kalır bu da hasta uyuncunu olumlu yönde etkileyebilmektedir. Yara üzerinde kalıntı bırakmazlar ve re-epitelizasyon üzerinde olumlu etkileri vardır. Bunların yanında fazla miktarda su absorbe edememeleri eksuda birikimine ve kötü kokuya neden olurken, mekanik dayanıksızlıkları uygulamada sorun oluşturabilmektedir (Boetang ve ark, 2008). Düşük mekanik stabilite göstererek dayanıksız olmalarının nedenleri arasında; polimer ağlarının yeterince homojen olmaması, tek polimer zincirleri arasındaki düşük sürtünme ve içeriklerindeki polimer miktarının sadece %5-10 kadarının polimerden oluşması gösterilebilir. Buna çözüm olarak uygun polimer seçimi, öncü moleküllerde kimyasal modifikasyon ya da fiziksel modifikasyonlar önerilmiştir. Gong ve arkadaşlarının oluşturduğu çift ağ hidrojeller, modifikasyon yapılarak sağlamlaştırılmış hidrojellere örnektir (Koehler ve ark., 2018; Gong, 2010).

Hidrojel örtüler genel olarak üç tipte değerlendirilir. Bunlar; amorf yapıda olanlar, gazlı beze emdirilmiş olanlar ve tabaka halinde olanlardır (Vowden ve Vowden, 2017).

Literatürde hidrojellerin yara örtüsü olarak kullanılmalarıyla ilgili oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Hidrojinin ideal özelliklerine ek olarak antimikrobiyal etkiye de duyulan ihtiyaçla birlikte gümüş nitrat da içeren polikasyonik bir hidrojel sentezlenmesi ile ilgili yapılan çalışmada olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Palantoken ve ark., 2016). Bir başka çalışmada oksijen ve iyot salgılayabilen hidrojel örtü geliştirilmiş ve kronik yaralar için uygun bulunmuştur (Nice, 2014). Diğer bir çalışmada diyabet yaralarının tedavisinde kullanılmak üzere Glucomannan (jel yapıcı ajan), keratin ve *Avena Sativa* içeren hidrojel tabanlı bir yara örtüsü tasarlanmış ve yara iyileştirme tedavisi için etkili olduğu bildirilmiştir (Veerasubramanian ve ark., 2018).

1.3.1.2.7. Köpük örtüler

Bu sınıftaki örtüler poröz poliüretan köpük, poliüretan köpük film ya da silikondan oluşmaktadır. Poliüretan köpükler iki ya da üç tabakadan oluşup yara ile

temas eden kısımları hidrofilik, sırt kısımları ise hidrofobiktir. Köpük parçalarının gevşek delikli polimerik film torbaya konulması ile Allevyn cavity[®], Cavi-care[®] gibi vücut boşluklarındaki yaralara uygun ticari preparatlar üretilmiştir. Silikon köpükler yara şekline uyabilecek şekilde genişleyen ve yarayı dış etkilerden koruyabilen yapıdadır (Jones ve ark., 2006). Köpük örtüler genel olarak nem geçirgenliğine sahip, absorplama kapasiteleri yüksek ve termal yalıtım sağlayabilen tiptedir. Bu sebeple derin yaralarda ikincil bir örtüye ihtiyaç duyulmadan kullanılabilirler. Antimikrobiyal, antiinflamatuvar analjezik ya da nemlendirici etkili maddeler bu dozaj formu ile verilebilir (Vowden ve Vowden, 2017). Ticari preparatların diğer örnekleri; Tielle[™], Lyofoam[®] ve Allevyn[®] olarak sayılabilir (Boetang ve ark., 2008).

1.3.1.2.8. Larva örtü ve koku giderici örtüler

Lucilia sericata larvalarının 'Biobag' denilen bir pakete konulması ile elde edilen yara örtüsünün iyileşmeyi arttırdığı, damar oluşumunu desteklediği ve enfeksiyonu önlediği bildirilmiştir. Bu tedavi 4-5 gün kadar sürmektedir. Hastada kontrendikasyon gelişebileceğinden dikkatle uygulama yapılmalıdır (Vowden ve Vowden, 2017).

Özellikle iyileşmeyen, habis yaraların oluşturduğu kötü koku hasta açısından rahatsızlık vericidir. Bu kokuyu azaltmak amacıyla kömür içeren örtüler kullanılmaktadır. Bu örtülere antibakteriyel etkiyi destekleyici gümüş iyonu da eklenmektedir. Metronidazol da kötü kokuyu azaltan bir ajan olarak bu tip örtülerde kullanılabilir (Vowden ve Vowden, 2017).

Larva terapisinin daha çok ölü hücreli ve enfeksiyonlu yaralar için uygun olduğu bildirilmiştir. Özellikle Metisiline direnç kazanmış *Staphylococcus aureus* için olduğu gibi ilaca dirençli vakalarda oldukça etkilidir. Maliyet olarak uygun ve kontrendikasyonu bulunmayan bir uygulama olarak değerlendirilmekle birlikte örtülerin raf ömrü kısadır (S. Kumar ve ark., 2004).

1.3.1.2.9. Biyolojik örtüler

Bu tip örtülere yara iyileşme sürecinde aktif rol oynadıkları için 'biyoaktif örtüler' de denilmektedir. Doğal dokulardan ya da yapay kaynaklardan doku mühendisliği ile üretilebilirler. Genel olarak kollajen, kitozan, aljinat, hiyalüronik asit, glikozaminoglikan ya da elastin gibi polimerler kullanılır. Üretimlerinde biyouyumlu materyallerin kullanılması yara iyileşmesi sürecinde avantaj olarak değerlendirilir. Biyoparçalanabilen yara örtülerinin emilmeleri ya da dokudan çıkarılmaları daha kolaydır. Parçalanmayan yara örtüsü oranı işlevsel bir eksiklik ya da bozukluk olmaması için yenilenen doku oranıyla örtüşmelidir (USP 40–NF 35 General Information /1046 Cellular and Tissue-Based Products). Antibakteriyel ajanlar ve büyüme faktörleri ile bu örtülerin etkileri desteklenebilmektedir (Boetang ve ark, 2008). Hyalofill®, Hyalofill® (Anika Therapeutics) ve Hyalo⁴ Regen (Fidia Pharma GmbH) hiyalüronik asitten oluşan yara örtülerine ticari örneklerdir (Koehler ve ark., 2018).

Yara iyileşmesinde kullanılan biyouyumlu yara örtüleri literatürde özellikle doku mühendisliğinde yapı iskeleleri (skafold) olarak da isimlendirilmekte ve hücreler arası bağlanmayı ya da proliferasyonu destekleyerek yeni doku oluşumunu kolaylaştıran geçici yapılar olarak tanımlanmaktadır. Skafold en güncel yara örtülerinden biri olarak değerlendirilebilir (Ovsianikov ve ark., 2018; Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

Ekstrasellüler matris ve türevleri, hücre-biyomateryal temelli kombinasyon skafoldların oluşturulmasında kullanılırlar. Bunun için kollajen ya da fibrin gibi proteinler, kitozan gibi bir polisakkarit ya da glikozaminoglikanlar kullanılabilir. Kollajen hücre ekimi için en yaygın kullanılan substrattır. Kollajen gibi doğal polimerlerin dayanıklılığını arttırmak için glutaraldehit gibi çapraz bağlama ajanları tercih edilmektedir. Skafoldların hazırlanmasında en çok kullanılan sentetik polimerler ise poliglikolik asit ve polilaktik asittir (USP 40–NF 35 General Information /1046 Cellular and Tissue-Based Products).

Skafoldlar genel olarak sert ve yumuşak olmak üzere iki sınıfta incelenirler. Sert skafoldlar kan damarı dokusu gibi bir dokuda kullanılmak üzere şekli sabit kalacak

tasarlanmışlardır. Yumuşak skafoldlar ise esnektir (USP 40–NF 35 General Information /1046 Cellular and Tissue-Based Products).

Literatürde biyolojik örtü sınıfına giren doku mühendisliği ile oluşturulan deriler olarak da ifade edilen 'cilt süstitüeleri' karşımıza çıkmaktadır. Bunlar matriks proteinleri ve doku hücreleri kullanılarak oluşturulmaktadır. Ticari ürünler incelendiğinde, epidermal keratinositlerin kültüre edilmesi ile oluşturulmuş Epice1™, glikolik asit ile oluşturulmuş skafoldun içinde neonatal fibroblastların kültüre edilmesi ile üretilmiş Dermagraft®, dermis ve epidermise eşdeğer iki tabakalı şekilde tasarlanmış Apligraf™ gibi cilt süstitüeleri görülmektedir. Ticari preparatlara diğer örnekler; TransCyte™, OrCel™, Oasis™, E-Z-Derm™, VivoDerm™, EpiDex™, Integra™ olarak verilebilir (M. Silva ve Castro, 2002; Ehrenreich ve Ruszczak, 2006; Boucard ve ark., 2007; Schneider ve ark., 2009). Cilt süstitüelerinin kullanımlarını sınırlayan; yetersiz vaskülarizasyona bağlı hücrelerin ölebilmesi, zayıf mekanik özellik göstermeleri, sağlam doku ile birleşememeleri ve alerjik reaksiyon ortaya çıkabilmesi gibi durumlar mevcuttur. Ek olarak hücrelerin kültüre edilmesi vakit aldığından bu materyallerin üretimleri zor ve pahalıdır (Vig ve ark., 2017).

Sağlıklı deri dokusunun izole edilerek yara bölgesinde kullanılması ile greft uygulamaları da biyolojik örtü kapsamında değerlendirilebilir. Greftler oluşturulurken epidermis ve dermisin epidermise yakın olan kısımları kullanılabildiği gibi (kısmi kalınlıkta deri grefti (split-thickness skin grafts)), epidermisin ve dermisin tamamının kullanıldığı uygulamalar (tam kalınlıkta deri grefti (full-thickness skin grafts)) mevcuttur. Başka bir sınıflandırma da doku vericisine göre yapılır. Kişinin kendi dokusu greft olarak kullanıldığında otogreft, greft başka bir insandan elde edildiğinde allogreft (homogreft), başka bir canlıdan elde edildiğinde de ksenogreft (heterogreft) olarak isimlendirilir. Allogreft ve ksenogreft için immünolojik doku reddi söz konusu olduğundan geçici süre ile kullanılabilirler. Bununla birlikte bu iki tip greftin eldesi otogreft eldesi kadar kısıtlı değildir (Sun ve ark., 2014). Greftlerin en önemli dezavantajı HIV gibi taşınabilir virüslerin bulaşması konusunda risk oluşturmalarıdır (M. Silva ve Castro, 2002).

1.3.1.2.10. Yara örtülerinde güncel yaklaşımlar

Yara örtülerinin üretimi için gelişen teknoloji ile birlikte son dönemde daha kompleks modeller oluşturulmaktadır. Nanopartikül, kil, karbon ve metal oksitleri içeren kompozit ürünler kullanılarak yara örtüleri geliştirilmektedir (Kamoun ve ark., 2017). Kollajen matriksleri fibroblastlarla birleştirmek ya da keratinositlerle epidermal bir yüzey oluşturmak gibi modeller için farklı üretim yöntemleri çalışılmaktadır. Dondurarak kurutma, üç boyutlu (3B) yazıcılar kullanımı, elektroğirme yöntemi (electrospinning) ve çip üzerinde deri (skin-on-a-chip model) kullanılan yeni teknolojiler arasında sayılabilir. Kollajen ve kitozan kullanılarak bu yöntemler ile üretilen yara örtüsü çalışmaları mevcuttur (Yun ve ark., 2018).

Yara örtüsü üretiminde 3B yazıcı teknolojisinin kullanılmasının en önemli avantajı hedeflenen klinik uygulamaya özel iyileştirmelere olanak tanınması ve yüksek tekrarlanabilirlik ile materyallerin üretiminin sağlanabilmesidir. Bu nedenle yara örtülerinin üretiminde standartlaşmayı sağlamak adına da uygun bir yöntem olduğu söylenebilir. Bu yöntem ile cildin farklı tabakaları istenilen kalınlıkta katman katman basılabilir ve elde edilen iskelenin yapısı hassas olarak kontrol edilebilir (Ng ve ark., 2016; Cubo ve ark., 2016; Vijayavenkataraman ve ark., 2016). Bu yöntem ile yara örtülerinin üretiminde seramikler, doğal ve sentetik biyoplastikler, hücreler ya da büyüme faktörleri ile birleştirmiş hidrojeller, proteinler ve biyomoleküller kullanılabilir. Örnek olarak 3B yazıcı ile cerrahide yumuşak dokularda kullanılmak üzere jelatin, elastin ve sodyum hiyalüronat içeren bir membran üretilmiş olup, mekanik özellikleri uygun bulunmuştur (Tayebi ve ark., 2017). Başka bir çalışmada bu teknoloji ile iki farklı tipte nanoselüloz kullanılarak poröz yapıda yara örtüleri üretilmiş ve poröz kısımlara antimikrobiyal ilaç yüklemesi yapılabileceği bildirilmiştir (Rees ve ark., 2015). 3B yazıcı ve hot melt teknolojileri birlikte kullanılarak burna ve kulağa uygulanabilecek şekilde polikaprolakton, çinko ve gümüş içeren antimikrobiyal yara örtüleri tasarlanmış ve kişiye özel tedavide olumlu sonuçlar ortaya çıkmıştır (Muwaffak ve ark., 2017). Katman katman membran üretimi yapılabilmesine olanak tanıyan 3B uygulamaları bu alanda yine de sert dokuların üretimindeki sıklıkta kullanılamamaktadır. Bunun nedenlerinden biri örtü üretiminde kullanılan malzemelerin reolojik özelliklerinin risk oluşturmasıdır.

Bu kapsamda 3B jelatin bazlı membran üretim sürecinin değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır (Tayebi ve ark., 2018).

Elektroçirme yöntemi ile yara örtülerinde hazırlanmasında kullanılmak üzere mikrometre ve nanometre boyutunda liflerin üretimi mümkündür. Bu yöntemin kolay uygulanabilir, çok yönlü ve etkili bir seçenek olduğu bildirilmiştir. Bu yöntem ile yüksek derecede porlu bir iskele elde edilmektedir, böylece ekstraselüler matriks yapısı taklit edilebilmekte ve porlu yapı hücrelerin tutunup proliferasyon olabileceği bir yapı sağlamaktadır (Noh ve ark., 2006; Pan ve ark., Chen 2006; Fu ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada elektroçirme ile serisin/polivinil alkolden üretilmiş liflere tigesiklin yüklenerek antimikrobiyal etkili yara örtüleri üretilmiştir (Chao ve ark., 2018).

Dondurarak kurutma yöntemiyle poröz yapıda yara örtüleri elde etmek mümkündür. Örnek olarak, bu yöntemin uygulandığı bir çalışmada, çapraz bağlı kitosan-jelatin hidrojelleri ile oluşturulmuş poröz yapıda skafoldlar biyouyumlu bulunmuş ve bunların doku iyileşmesi için kullanımlarının uygun olduğu bildirilmiştir (Carvalho ve Mansur, 2017).

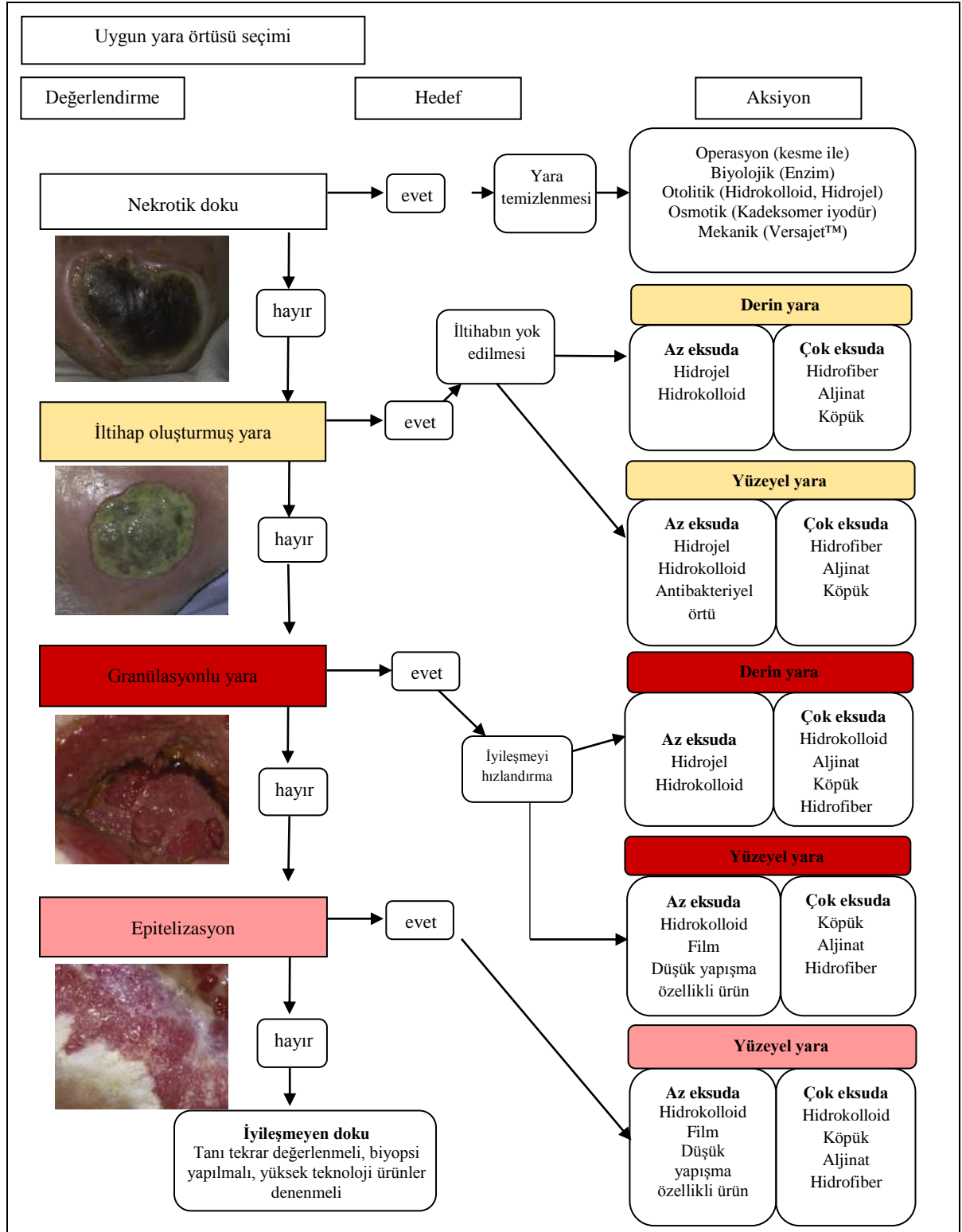
Keratinositlerin biyolojik matrikslerde kültürü ile epidermis oluşturulmasına yönelik çalışmalar da mevcuttur. Bu modeller “yeniden oluşturulan insan epidermisi (reconstructed human epidermis, RHE)” olarak adlandırılır ve proliferasyon markerları, dermal-epidermal bağlantı markerları gibi spesifik markerları da yapılarında içerirler. Bu kapsamda laboratuvar ortamında cilt iritasyonu, DNA hasarı, UV (mor ötesi) ışını maruziyeti gibi çalışmalarda kullanılmak üzere SkinEthic™ RHE, EpiSkin™ ve EpiDerm™ isimli epidermis modelleri bulunmaktadır. Bu modellerin pigmentasyon/depigmentasyon çalışmalarında kullanılmak üzere melanosit içeren versiyonu da bulunmaktadır. Bu şekilde üretilen bir epidermis modelinin yara ve yanık tedavisinde de kullanılabileceği bildirilmiştir (Rehder ve ark., 2004). Yine benzer olarak keratinositler ve fibroblastları içeren “yeniden oluşturulan insan derisi (reconstructed human skin)” mevcuttur. Bu modellere örnek olarak T-Skin™ ve EpiDermFT™ verilebilir (Netzlaff ve ark., 2005; Yun ve ark., 2018; Gordon ve ark., 2015).

Yapılan bir çalışmada kronik iyileşmeyen diyabet yaralarında, azaltılmış grafen oksit yüklü İsabgol (*Psyllium* kabuğu) nanokompozit yapılı yara örtüleri hazırlanmış ve bu örtülerin anjiogenez ve kollajen sentezinde olumlu etkileri gözlenmiştir (Thangavel ve ark., 2018). Başka bir çalışmada ince bağırsak submukoza membranı ve kriyojelinden oluşan çift tabakalı bir yara örtüsü geliştirilmiş ve tam kat yaraların iyileşmesinde olumlu etkileri tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2018). Metal nanopartiküllerin biyolojik kaynaklı sentezinin önem kazanması ile *Delonix elata* bitkisinin yapraklarının ekstraktı kullanılarak sentezlenmiş gümüş nanopartiküller ile kaplı örtü uygulaması sonucu anorektal yaranın tedavisinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Y. Wang ve ark., 2018). Antibakteriyel ilaç yüklü poli-N-izopropil akrilamid mikrojel boncuklarla Eudragit®E kullanılarak yara örtüsü tasarlanmış ve bu örtünün sıcaklığa duyarlı, kendiliğinden yapışabilen ve yaradan da kolayca soyulabilen özellikte olduğu bildirilmiştir (Lin ve ark., 2001). Başka bir çalışmada, direnç gelişimini önlemek amacıyla sadece ihtiyaç halinde antimikrobiyal madde salan akıllı bir yara örtüsü geliştirilmiştir. Hem teşhis hem de tedavide kullanılabilen bu örtü, antimikrobiyal ve floresan veziküller içeren biyouyumlu UV-çaprazbağlı metakrilat jelatinden oluşmaktadır (Zhou ve ark., 2018).

1.3.2. Yara örtüsü seçimi

Uygun yara örtüsünün seçimi için öncelikli olarak yara değerlendirilmeli ve istenilen sonuç belirlenmelidir. Yara nekrotik doku halini almışsa yaranın temizlenmesi öncelikli hedef olmalıdır. Bunun için otolitik etkili örtüler (hidrokolloit, hidrojel), Cadexamer içeren osmotik etkili bir örtü ya da açık yaralara yapışma özelliği gösteren böylece nekrotik yaralardaki ölü dokuların atılmasında kullanılan absorptif pansumanlar (gaz bezi gibi) tercih edilebilir. Eğer yara iltihaplı ise az eksudalı yaralarda hidrojel, hidrokolloid ve antimikrobiyal ajan içeren örtüler etkili iken, çok eksudalı yaralarda hidrofiber, aljinat ve köpük örtüler istenilen sonucu verebilir. Yara granülasyonlu ise ya da epitelizasyon başlamış ise iyileşmeyi hızlandırmak adına derin yaralar için hidrokolloid ve hidrojeller, yüzeysel yaralar için film veya düşük adeziv özellik gösteren örtüler seçilir. Bu yara tipinin çok eksudalı olması durumunda yine aljinatlar kullanılabilir. Yara iyileşmesi gerçekleşmiyorsa tanı tekrar değerlendirilmeli ya da yüksek teknoloji ürünler denenmelidir (Vowden

ve Vowden, 2017). Yara sınıfına uygun yara örtüsü seçimi ile ilgili şekil 5'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 5. Yara sınıfına uygun olarak yara örtüsü seçimi (Vowden ve Vowden, 2017)

1.3.3. Etken madde içeren yara örtüleri

Yara örtülerine terapötik etkisi olan maddeler yüklenebilmektedir. Bu şekilde topikal olarak uygulanan konvansiyonel dozaj formlarının dezavantajlarının önüne geçilebilmekte aynı zamanda ilaçların sistemik olarak uygulandıklarında görülen böbreklerde birikme, antimikrobiyal direnç, sistemik toksisite gibi etkiler görülmemektedir. Antimikrobiyal ajanlar potansiyel enfeksiyonları önlemeleri bakımından tercih sebebidir. Konu ile ilgili literatürde gümüş sülfadiazin içeren polikaprolakton ve polivinil alkolden elektroegirme teknolojisi oluşturulmuş yara örtüsü (Mohseni ve ark., 2016) ve polikaprolaktona nanofiberlere levofloksasin yüklenmesi ile elde edilmiş antibakteriyel yara örtüsü çalışmaları örnek olarak gösterilebilir (Pásztor ve ark., 2017). Bunlara ek olarak gümüş nanopartikülleri içermesinin yanında fibroblast enkapsülasyonunun da yapıldığı (Rigo ve ark., 2013) ve metakrilik asitten hareketle nanoemülsiyon polimerizasyonu kullanılarak gümüş iyonu, *Aloe vera* ve zerdeçal içeren nanohidrojel ile oluşturulmuş daha yenilikçi antimikrobiyal yara örtüleri de mevcuttur (Anjum ve ark., 2016). Aynı şekilde büyüme faktörleri de yara örtüleri ile kullanılabilir. Büyüme faktörleri, hücre bölünmesi, hücrelerin göç etmesi, hücre farklılaşması ve protein ekspresyonu gibi olayları etkileyerek yara iyileşmesinde fizyolojik aktif rol oynamaktadırlar. Anjiyogenez, hücre proliferasyonu-inflamasyonu ve fibroblast aktivitesi yine büyüme faktörlerinden etkilenmektedir (Boetang ve ark., 2008). Literatürde yara iyileşmesinde kullanılmak üzere heparin ve hidrojelden oluşan epidermal büyüme faktörünün yüklendiği bir yara örtüsü üretilmiş bu örtünün iyileşmeyi arttırabileceği bildirilmiştir (Goh ve ark., 2016). Epidermal büyüme faktörünün ibuprofen gibi analjezik etkili bir ajan da yara örtüsüne yüklenebilir (Biatain Ibu™ ; 0,5 mg·cm⁻¹ İbuprofen; Coloplast AG) (Koehler ve ark., 2018). Bunlara ilave olarak vitamin A, C, E gibi vitaminler ve çinko bakır gibi mineraller yara iyileşmesi sürecine katkı sağlayabilmeleri için yara örtülerine yüklenebilmektedir (Boetang ve ark., 2008).

Yara örtülerinden hidrofilik polimerler kullanılarak kontrollü ilaç salınımı sağlanabilmektedir. Bu şekilde sürekli değiştirilmelerine gerek duyulmayacağından hasta uyuncu artabilmektedir (Boetang ve ark., 2008).

1.4. Kollajen Hakkında Genel Bilgiler

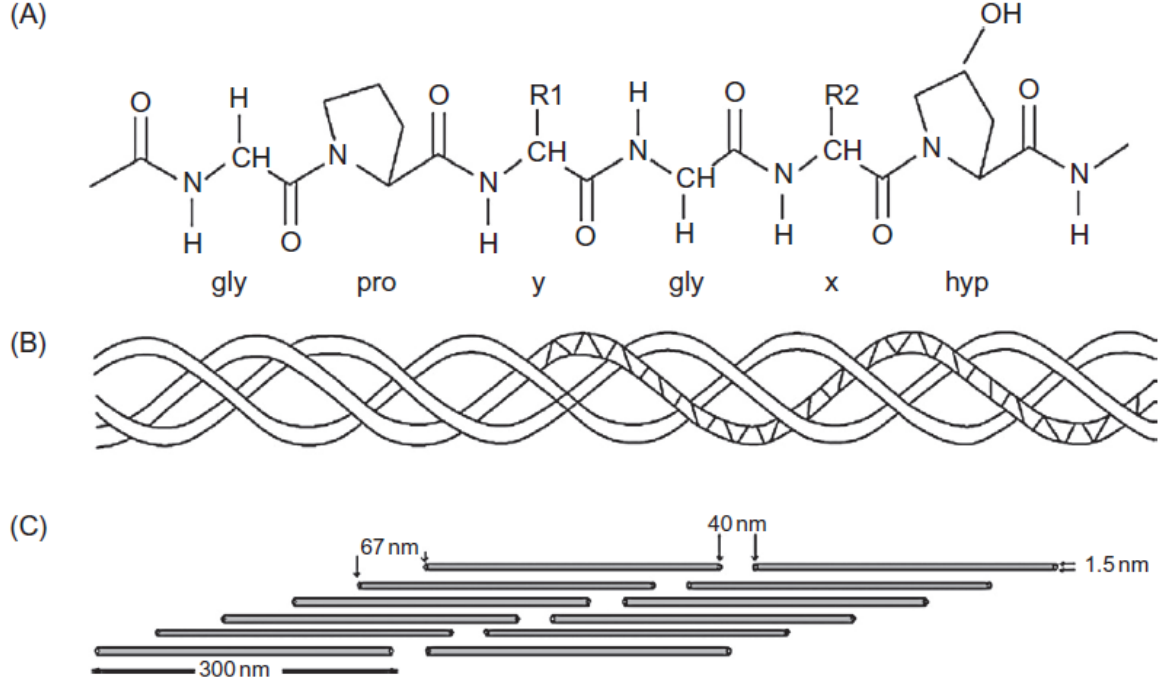
Ekstrasellüler matriks proteinlerinden biri olan kollajen, bağ dokunun doğal bir bileşenidir. Hücrel davranışa ve immün cevaba etkisi olduğu bildirilen kollajen yara iyileşmesinin başlamasından, yara izinin son halini almasına kadar olan süreçte önemli bir rol oynamaktadır (Yuan ve ark, 2013). Biyoyumlu ve enzimatik olarak parçalanabilir bir protein olmasının yanında fibroblastların şekillenmesinde ve endotelial hücrelerin hasarlı dokuya göçünde etkindir. Kollajen biyomatrisi, bu polimerin antimikrobiyal özellikteki etken maddeler içerebilecek bir dozaj formu olarak kullanılabilmesi için uygundur. Kollajen kullanılarak üretilmiş FDA onaylı medikal implantlar, jeller, köpükler ve membranlar yara iyileşmesinde kullanılmaktadır. Bu olumlu özelliklerinin yanında yeniden üretilebilirliğinin zorluğu ve sınırlı mekanik özellikleri kullanımını kısıtlamakta ya da sentetik bir polimerle desteklenmesini gerektirmektedir (Boetang ve ark, 2008; Değim 2008; Sargeant ve ark, 2012).

Farklı kollajen tipleri vücudun farklı bölgelerine yerleşmiş durumdadır. Tip I kollajen, cilt, tendon, vasküler bağlar, organlar, kemiklerin ana bileşenini oluşturmaktadır. Gözde korneada da bulunmaktadır. Tip II kollajen ise hiyalin kırırdağın karakteristik bileşenidir. Ek olarak camsı cisimcikte ve omurilik sıvısında olduğu bilinmektedir. Tip III kollajen retiküler liflerin ana bileşenidir, cilt ve damar duvarlarında da bulunmaktadır. Tip IV kollajen hücre bazal membranının en önemli yapısal bileşenidir. Tip V kollajen tip I kollajen ile birlikte ciğer, kornea ve fetal membranlarda görülür. 20'den fazla tipte kollajen tipi açıklanmış olmakla birlikte bu sayı yapılan araştırmalarla daha da artmaktadır (Gelse ve ark., 2003).

1.4.1. Kollajenin yapısı

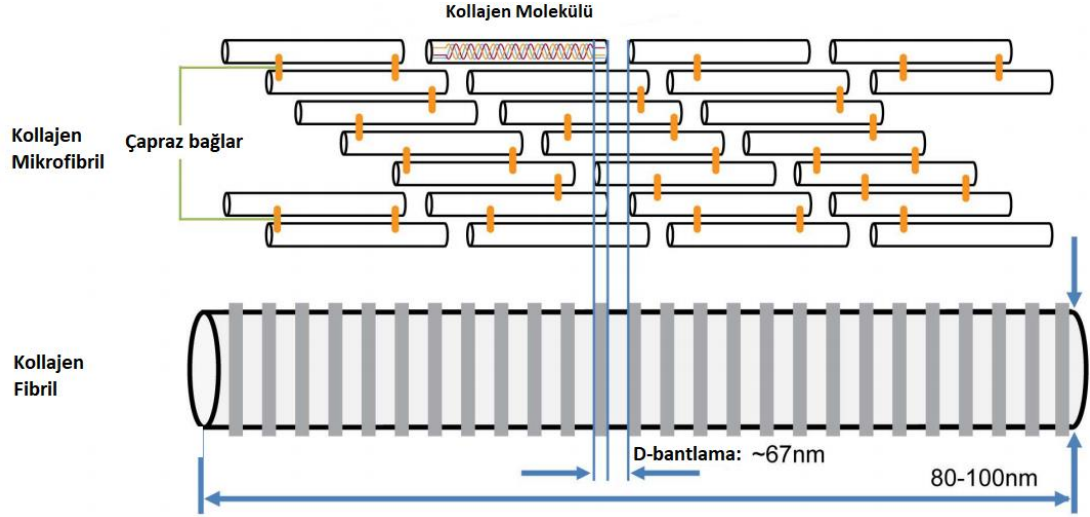
Kollajenin yapı taşı aminoasitlerdir ve bir kollajen zincirinde 1000'den fazla aminoasit bulunur. Aminoasitler Glisin-Prolin-Y ve Glisin-X-Hidroksiprolin şeklinde tekrar eder ve tripeptid dizileri oluştururlar. Buradaki X herhangi bir aminoasidi ifade eder. Tripeptid dizileri bir eksenin etrafında sarmal halinde α zincirlerini oluşturur. Üç adet α zinciri de birbirinin etrafında dönerek kollajenin alt birimi olan üçlü heliks yapıyı oluştururlar. Bu alt birimler boşluklar aynı hizada olmayacak

şekilde üst üste konumlanırlar. Kollajen lifinin sert, dirençli ve esnek yapısı bu dizilimden kaynaklanır. Bu durum Şekil 6'da açıklanmıştır (Khor, 2014).



Şekil 6. Kollajenin yapısı. Amino asit dizisi (A), üçlü heliks yapısı (B) ve heliks yapıların bir araya gelmesiyle oluşmuş zigzag yapısı (C) Gly, glisin; pro, prolin; hyp, hidroksiprolin olarak ifade edilmiştir (Khor, 2014).

Kollajenlerin yapılarına ve moleküler organizasyonlarına dayanarak; fibril oluşturan kollajenler, fibril ilişkili kollajenler, ağ oluşturan kollajenler, fibril bağlayanlar, trans membran kollajenler, bazal membran kollajenleri ve diğer işlevlere sahip kollajenler şeklinde sınıflandırılma yapılabilmektedir (Gelse ve ark., 2003). Örnek olarak Tip I kollajen moleküllerinin üst üste paralel halde oluşturdukları mikrofibriller bir araya gelerek üç boyutlu fibrilleri meydana getirir. Tekrarlayan karakteristik uzun çubuksu sıralara D-bantlama (D-spacing) denilmektedir. Bahsi geçen tip I kollajene ait fibriller yapısı Şekil 7'de gösterildiği gibidir (Canelón and Wallace 2016).



Şekil 7. Kollajenin fibriler yapısı ve organizasyonu (karakteristik D-bantları)
(Canelón and Wallace 2016)

1.4.2. Kollajenin eczacılıkta kullanım alanları

Kollajen, hemostatik etkili olması, dokuları onarıcı özelliği bulunması ve biyouyumluluğu ile cerrahide konvansiyonel yöntemlerin yetersiz kaldığı ya da etkili olmadığı yaraların tedavisinde kullanılabilir. Kejibang Medikal Kollajen Sünger® (<http://www.dmcmedikal.com.tr/kolajen-membran.html>, Erişim tarihi: 03 Haziran 2018) ve BoneProtect® Guide (<http://dentegris.com.tr/boneprotect-guide-naturel-kollajen-rezorbe-membran/>, Erişim tarihi: 03 Haziran 2018) cerrahide kullanılan ticari preparatlara örneklerdir. Bunun yanında hastalıkların tanısı için yapılan görüntülemelerde kollajenden destek alınmasıyla ilgili bir çalışma da mevcuttur (Wahyudi ve ark., 2016).

Kollajen genç deride ağ örgüsü halinde dermise yayılmış durumdadır ve arasında diğer bir bağ dokusu bileşeni olan elastin iplikçikler bulunmaktadır. Çözünen ve çözünmeyen birimlerden oluşan kollajen proteininde, yaşlanma arttıkça çözünmeyen fraksiyonun oranı artmaktadır. Bu durumu iyileştirmek amacıyla piyasada kollajen içeren krem, jel ve intradermal olarak uygulanabilen parenteral kozmesötik ürünler mevcuttur (Badıllı ve Tarımcı, 2016).

Kollajen hematolojik ilaçlardan absorbe edilebilir ve diğer lokal hemostatikler farmakolojik grubuna dahildir. Mikro fibriller kollajen hemostat (Avitene™) toz halinde bulunan kollajenden oluşan bir preparattır. Kapiller kanama olan doku

yüzeyine toz olarak uygulanır. Burada trombositlerin tutulmasını sağlar, sırası ile tıkaç ve pıhtı meydana gelir (Yarış ve ark., 2009).

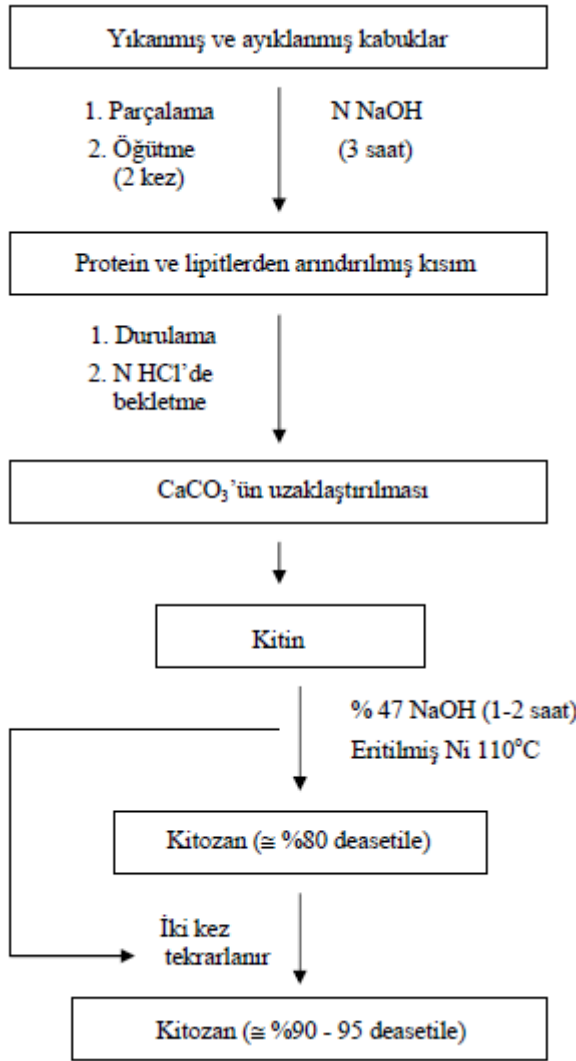
1.4.3. Kollajenin ticari preparatları

Kollajenin tek başına ya da vitamin C, B1, B2, B6, D3, K2, metilsülfonilmetan, pantotenik asit, kalsiyum karbonat, koloidal gümüş, çinko sülfat, glukozamin sülfat, sodyum hiyalüronat, kondroitin sülfat A, gibi ajanlarla, ek olarak Hint günlük ağacı (*Boswellia serrata*) ekstresi, Barbados kirazı (*Malpighia punicifolia L.*) konsantresi, Köpek gülü (*Rosa canina L.*) meyve ekstresi, Zerdeçal (*Curcuma longa L.*) kök ekstresi ile kombinasyonu halinde müstahzarları mevcuttur (Rx media pharma 2018).

Ped, solüsyon, sprey, tablet ve toz dozaj formlarında preparatları mevcuttur (Rx media pharma 2018).

1.5. Kitozan Hakkında Genel Bilgiler

Ticari olarak yengeç, karides, ıstakoz gibi eklembacaklı hayvan kabuklarının kimyasal işlemle geçirilmesiyle elde edilen biyoaktif bir polimerdir. Buna ek olarak bazı bakteri ve mantarların hücre duvarında bulunan kitinden hareketle de üretilebilir. Poliglusam ya da deasetilkitin olarak da bilinmektedir. Oral dozaj şekilleri ve gen taşıyıcı sistemler de dahil ilaç yardımcı maddesi olarak kullanılmak üzere araştırılmaktadır (Gameil ve ark., 2014; Şenel, 2014). Obezite ve hiperkolesterolemiye karşı hazırlanan beslenme desteği preparatlarında kullanılmaktadır (Ylitalo ve ark., 2011; Jull ve ark., 2008). Kitozanın eldesi şekil 8'de şematik olarak gösterilmiştir. Kitozanın eldesinde, yıkanmış ve ayıklanmış kabukların ekstraksiyonu ile elde edilir. Sonrasında da elde edilen kısımların deasetilasyonu gerçekleştirilir (Sezer, 2006).



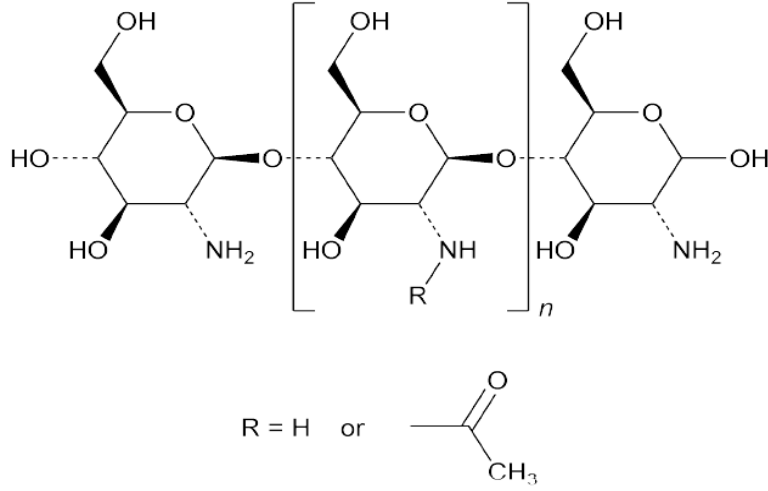
Şekil 8. Kitozanın elde edilmesi (Sezer, 2006)

Kitozanın 2 °C - 8 °C'de nem ve ışıktan korunarak saklanması gerekmektedir (EP 9.0 Chitosan Hydrochloride Monograph).

1.5.1. Kitozanın yapısı ve fiziksel özellikleri

Kitozan, birbirine β (1-4) bağı ile bağlı N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozaminden oluşan uzun zincirli bir polisakarittir. Kitozan kitinin deasetilasyonu ile elde edilir ve kitinden farklı olarak hidrofilik özelliktedir. Yapısındaki D-glukozamin birimleri nedeniyle pozitif yüke sahiptir (Sezer, 2006; Alpar, 2014). Deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı ve iyonik gücü fizikokimyasal ve biyoaktif özelliklerini etkileyen başlıca parametrelerdir. Çözünürlüğü deasetilasyon derecesine (%70-%95) bağlıdır. Poli- β -(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz şeklinde

isimlendirilebilir (Şekil 9) (USP 40–NF 35 Official Monographs / Chitosan; Sezer, 2006; Şenel, 2014).



Şekil 9. Kitozanın kimyasal yapısı (USP 40–NF 35 Official Monographs / Chitosan)

Kitozan, beyaz veya kremsi renkte, farklı büyüklüğe sahip, suda az, bazı zayıf asit çözeltilerinde ise kolayca çözünebilen bir biyopolimerdir. Suda çözünebilen tuz ve türevleri bulunmaktadır. Asetik asit, laktik, propiyonik ve bütirik asit gibi organik asitlerde çözünmesine rağmen perklorik, hidroklorik ve nitrik asit gibi mineral asitlerde kısmen, sülfürik ve fosforik asitte ise hiç çözünmez. Molekül ağırlığı 50 Dalton'dan 1,5 kDa'ya kadar değişebilmektedir. Molekül ağırlığının değişkenlik göstermesi sebebi ile seyreltik asit ortamda geniş viskozite aralığına sahiptir (Sezer, 2006; Şenel, 2014).

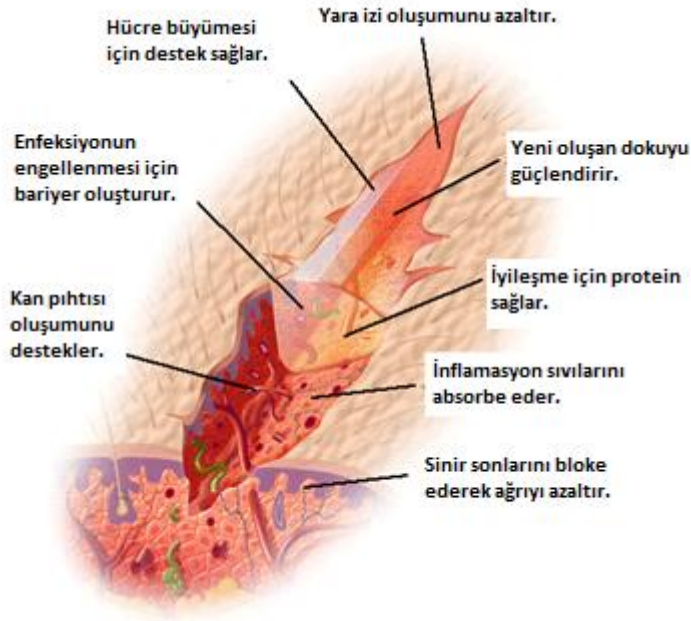
1.5.2. Kitozanın eczacılıkta kullanım alanları

Kitozan farmasötik ürünlerde değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Antikanserojen, immün sistemi uyarıcı ve analjezik etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalar sonucu bilinmektedir. Ayrıca ülser, hiperbilirubinemi ve kolesterol tedavisinde olumlu sonuçlar alınmıştır. Kitozanın tümör büyümesi ve metastaz üzerindeki etkileri de araştırılmış ve *in-vitro* olarak tümör hücrelerinin hücre proliferasyonunun kitozan ilavesi ile inhibe edildiği bildirilmiştir. Kitin ve kitozan gibi katyonik biyopolimerlerin, hafif alkali ve nötral ortamlarda mukoadhesif özellik göstermesinden faydalanılarak antifungal ve antimikotik etki gösteren formülasyonlar elde edilebileceği bildirilmiştir. Bakteriyostatik etkisi de literatürde

bildirilmiştir. Düşük molekül ağırlıklı kitozan tipleri silia hareketlerini aktive etmektedir (Sezer, 2006; Şenel, 2014).

Yara iyileşmesinin proliferatif evresinde granülasyonu arttırdığı bilinen kitozan yara ve yanıkların tedavisinde ve kemik iyileşmesinde kullanılmaktadır (Boetang ve ark, 2008; Şenel, 2014). İlave olarak hemostatik etkisi olduğu bilinmektedir ve bu durum mukoadezif özelliğine bağlanmaktadır (Brown ve ark., 2009). Makrofaj fonksiyonuna yardım ederek yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir (Şekil 10) (Paul ve Sharma, 2004).

Kitozan ve türevleri, farmasötik amaçlı olarak güç çözünen ilaçların çözünürlüğünün artırılması için katı dispersiyonların hazırlanmasında, tablet formülasyonlarında direkt basım maddesi ve yardımcı madde olarak (dolgu maddesi, adsorban, bağlayıcı ve kaydırıcı), sürekli etkili granüle hazırlanmasında, film kaplamada, kontrollü ilaç serbestleştiren preparatların (nanotaşıyıcı, boncuk, mikrosünger, implant, film vb.) hazırlanmasında, granül ve lipozomların kaplanmasında, hidrojel ve merhem sıvağı olarak kullanılmaktadır (Sezer, 2006). Biyomedikal amaçla da parçalanabilen sütür, ameliyat ve göz bandajları olarak, yapay deri ve böbrek membranları olarak, sert ve yumuşak lens yapımında, yara ve yanık örtü materyali olarak, spesifik protein/enzim absorpsiyonunda, hücre kültüründe, diş hekimliğinde ve ortopedide protezlerin hazırlanmasında, kolesterol düşürücü olarak ve kozmetik sanayinde (cilt ve saç bakımı ürünlerinde) kullanılmaktadır (Sezer, 2006). Fizyolojik pH'da çözünürlüğünün düşük olması nükleik asit kompleksleri düşük transfeksiyon göstermesine rağmen düşük molekül ağırlıklı kitozan ile DNA taşınmasında da kullanılabilceği bildirilmiştir (Alpar, 2014).



Şekil 10. Kitozanın yara iyileşmesinde avantajları (Paul ve Sharma, 2004).

1.5.3. Kitozanın ticari preparatlarda kullanımı

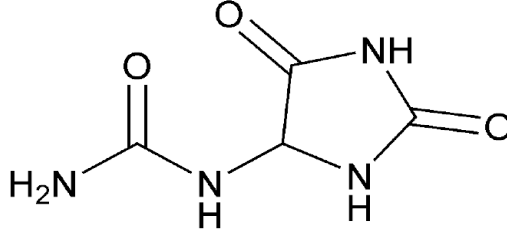
Kitozanın tek başına ya da vitamin C, Kuşdili (*Rosmarinus officinalis L.*) yaprak ekstresi, zeytin ağacı (*Olea europaea L.*) yaprak özütü ile kombine halde müstahzarları mevcuttur. Kapsül ve tablet dozaj formlarının içeriklerinde bulunmaktadır (Rx media pharma 2018).

1.6. Allantoin Hakkında Genel Bilgiler

Hayvansal ve bitkisel dokularda meydana gelen pürin metabolizmasının son ürünüdür (Braga ve ark., 2012). Allantoin molekülünden ilk 1838 yılında bahsedilmiş ve 70 yılı aşkın süredir farmasötik, kozmesötik ve kozmetik preparatlarda kullanılmaktadır (Araújo ve ark., 2010; Shestopalov ve ark., 2006). Allantoin plasentada, idrarda ve hamilelerin kan serumlarında tespit edilebilen ve hücre metaboliti olan doğal bir moleküldür. Dolayısıyla ucuz ve elde edilmesi kolaydır. Buğday tohumu, tütün tohumu ve karakafes köklerinden elde edilenler gibi bitkisel ya da hayvansal kökenli olabilmektedir (Shestopalov ve ark., 2006; Arakawa ve Maluf, 2018).

1.6.1. Allantoinin yapısı ve fiziksel özellikleri

(RS)-(2,5-Dioksoimidazolidin-4-il) üre IUPAC isimlendirmesi olup kapalı formülü $C_4H_6N_4O_3$ 'tür. Molekül ağırlığı 158.12'dir (Şekil 11) (USP 40–NF 35 Official Monographs / Allantoin).



Şekil 11. Allantoinin kimyasal yapısı (USP 40–NF 35 Official Monographs / Allantoin).

Allantoin bir hidantoin halkası ve bir üreido grubundan oluşmaktadır (Nishinami ve ark., 2018). Allantoinin sahip olduğu bu kimyasal yapı ile ortaya çıkan protein agregasyonunu baskılayıcı özelliğinden faydalanılarak hücre kültürü çalışmalarında, hücre toplamaaşamasında kullanılabileceği tespit edilmiştir (Arakawa ve Maluf, 2018; Nishinami ve ark., 2018).

Allantoin suda çözünür ve kolayca kristaller oluşturur. Alkalin solüsyonlarında kararsız haldedir (Arakawa ve Maluf, 2018).

1.6.2. Allantoinin farmakolojik özellikleri

Allantoin keratolitik ve penetrasyonu arttıran bir ajandır. Bileşimine girdiği kombine müstahzarlar çeşitli cilt hastalıklarında kullanılır. Hücresel proliferasyonu uyardığından yara iyileşmesini hızlandırıcı etkisi gözlenmektedir. Buna ek olarak deri irritasyonunu azaltıcı, antimikrobiyal ve anti-ülser etkilerinin olduğu da literatürde bildirilmiştir (Arakawa ve Maluf, 2018; Muangman, 2011; Özçelik ve ark., 2011).

Astrenjan etkisi ile yaralara bağlı kanamalarda proteinleri çöktürerek kanamanın durmasına katkı sağladığı bildirilmiştir (Yarış ve ark., 2009). Bununla birlikte yapılan bir çalışmada allantoinin yara iyileşmesi üzerindeki etki mekanizması araştırılmış olup, doku hasarı ve oksidatif stresten sorumlu reaktif türlerinin

salınımını önleyerek inflamatuvar hücrelerin kemotaksisini inhibe etmesi yolu ile inflamatuvar cevabı düzenlediği öne sürülmüştür. Aynı çalışmada deneklerde iyi şekillenmiş kollajen lifleri gözlenmiş olup, allantoinin yara iyileşmesi süresince fibroblast proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks sentezinde etkili olduğu bildirilmiştir. Deney yapılan tüm gruplarda yaranın meydana gelişinin 14. gününden itibaren kollajen sentezi, degradasyonu ve yeniden yapılanması sabit bir düzeyde kalmıştır (Araújo ve ark., 2010).

Allantoin farmasötik formülasyonlarda (Septalan®, Alphosyl lotion®) yaklaşık %2 konsantrasyonda kullanılırken, literatürde %5 oranına kadar kullanılmaktadır (Araújo ve ark., 2010). Ek olarak Thornton & Ross Ltd firmasına ait Anodesyn ointment® isimli bir merhem, %0,5 Allantoin ve %0,5 lidokain HCl'yi birlikte içermektedir. Bahsi geçen ürün antihemoroidal olarak kullanılmaktadır (<https://www.medicines.org.uk/emc/product/4821/smhc>, Erişim tarihi: 14.04.2018).

1.6.3. Allantoinin ticari preparatlarda kullanımı

Allantoin tek başına ya da heparin sodyum, klorheksidin glukonat, pantenol, mentol, sodyum hiyalüronat, sodyum klorür, vitamin C, alfa-tokoferol (E vitamini), enoksolon, kafur, soğan (*Allium cepa L.*) ekstresi, avokado (*Persea americana Mill.*), asma (*Vitis vinifera L.*) tohumu, tavşan memesi (*Ruscus aculeatus L.*), akşam çiçeği (*Oenothera biennis L.*) yağı, Barbados sarısabırı (*Aloe vera L.*), çay (*Thea sinensis L.*) yaprak ekstresi, dağ öküzgözü (*Arnica montana L.*) çiçek ekstresi ile kombinasyonları mevcuttur. Jel, krem, losyon, kulak damlası ve köpük formlarında preparatları mevcuttur (Rx media pharma 2018).

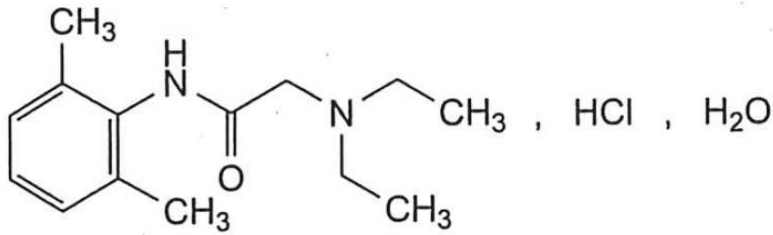
1.7. Lidokain HCl Hakkında Genel Bilgiler

Lidokain olarak da bilinmektedir (Weinberg 2015). Yapısı prokain gibi diğer lokal anestetiklerden farklı olduğundan bunlara alerjisi bulunanlarda kişilerde kullanımı tercih edilebilmektedir (Taşar ve Kayaalp, 2009). Lidokainin anneden fetüse geçiş miktarı yüksektir ve gebelik kategorisi B'dir (Lee ve Shin, 2017).

Lidokain ilk kez 1930'lu yılların başlarında keşfedilmiştir. 1940'lı yıllarda klinik denemeleri yapılan ve başarılı bulunan lidokain, diğer lokal anesteziyelere göre üstünlükleri bulunduğu için daha çok tercih edilir hale gelmiştir (Gordh, 2010).

1.7.1. Lidokain HCl'nin yapısı ve fiziksel özellikleri

İsimlendirmesi 2-(Diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl)asetamid hidroklorid monohidrat şeklinde olup, kapalı formülü $C_{14}H_{23}ClN_2O \cdot H_2O$ 'dur. Molekül ağırlığı 288.8'dir (Şekil 12) (EP 9.0 Monographs / Lidocaine Hydrochloride).



Şekil 12. Lidokain HCl'nin kimyasal yapısı (EP 9.0 Monographs / Lidocaine Hydrochloride)

Beyaz ya da beyaza yakın renkte kristal toz halinde bulunan lidokain HCl suda, etanolde ve organik solventlerde kolayca çözünebilmektedir (USP29).

1.7.2. Lidokain HCl'nin farmakolojik özellikleri

Lokal anestezi olarak migren, baş ağrısı ve kanser ağrısında kullanılır. Bu etkisinden faydalanılmak üzere sıklıkla enjektabl ve topikal formda ürünleri mevcuttur. Yüzeysel anesteziye olanak vermesi, etkisinin daha çabuk başlaması, dokuda daha iyi yayılması, etkisinin daha güçlü ve uzun olması gibi üstünlükleri de prokaine göre daha çok tercih edilmesine neden olmuştur (Taşar ve Kayaalp, 2009).

Yüzeysel anestezi etkisi elde etmek için lidokainin %2'lik ve %4'lük solüsyonları tercih edilir. Bir uygulamada kullanılabilecek maksimum lidokain miktarı 390 mg olarak verilmiştir. Günde maksimum 35 g olacak şekilde cilt ve anorektal bölgedeki lezyonlar için %2,5 ve %5'lik merhemler mevcuttur. Postherpetik nöraljiye endike %5'lik flaster dozaj şeklinde ürünler mevcuttur. %0,5'lik ve %1'lik solüsyonları infiltrasyon anestezi için kullanılır. Enjekte edilecek toplam lidokain bir uygulama için 4,5 mg/kg olarak belirlenmiştir. Bütün bölgesel blok şekilleri için

kullanılabilmektedir. Sinir bloğu için %1'lik solüsyonu 30 mL'ye kadar kullanılabilir. 'Cluster' baş ağrısı için, ipsilateral burun deliğine, 1 mL %4'lük solüsyonunun sfenopalatin fosa'ya erişebilecek şekilde damlatılmasının ağrıyı geçirebileceği bildirilmiştir (Taşar ve Kayaalp, 2009).

Lidokain ilk olarak lokal anestetik olarak çıkarılmasına rağmen, sonrasında antiaritmik olarak kullanılan bir ilaçtır. İntravenöz olarak; kalp cerrahisi, kalp karakterizasyonu ve akut myokard infarktüsü sırasında gelişen akut ventriküler aritmilerin önlenmesinde ve ortadan kaldırılmasında kullanılmaktadır. Bununla birlikte atriyum ve AV düğüm kaynaklı aritmilere karşı bir etkisi bulunmamaktadır. Dar spektrumlu bir antiaritmik ilaçtır. (Birincioğlu ve Kayaalp, 2009).

Lidokainin antiaritmik etki mekanizması incelendiğinde spontan diyastolik depolarizasyonu yavaşlattığı görülür. Bunun sodyum akımını azaltıp, potasyum akımının artırmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Aksiyon potansiyeline bakıldığında atriyum miyokardında değişmediği, purkinje lifleri ve ventriküler miyokardında belirgin biçimde kısaldığı görülür. Yine purkinje liflerinde ve ventriküler periyodunda refraktör periyodu daha az derecede kısalır. Bu sayede patolojik durumlarda gelişen asenkronizasyon düzeltilebilir. EKG'de QT mesafesinin kısaldığı görülebilir (Birincioğlu ve Kayaalp, 2009).

Lidokain oral verilmesini takiben hemen hemen bütünüyle absorbe olur, fakat karaciğerde %70 ilk geçiş metabolizmasına uğrar ve bu nedenle sistemik biyoyararlanımı sadece %30 düzeylerinde kalır. Lidokain sistemik etki için oral yoldan kullanıldığında vücutta geniş bir alana yayılır ve etkisi kısa sürer. Kalp ilgili yan etkilerinin az olması, intravenöz uygulandığında etkisinin hemen başlaması ve infüzyon kesildiğinde kısa zamanda sonlanması dozaj esnekliği avantajının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu da antiaritmide sadece parenteral uygulanabilirliğinin olumsuzluğunu azaltmaktadır (Birincioğlu ve Kayaalp, 2009). Sistemik etki için oral yoldan verilmese de oral topikal uygulamalar yapılarak lokal anestetik etkisinden faydalanabilmek mümkündür. Bu amaçla konvensiyonel dozaj formlarına ek olarak lipozoma enkapsülasyonunun yapılarak etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma mevcuttur (Franz-Montan ve ark., 2015).

1.7.3. Lidokain HCl'nin ticari preparatlarda kullanımı

Lidokain tek başına ya da sefalosporin grubu antibiyotikler, sodyum seskihidrat, ampisilin sodyum, sulbaktam sodyum, adrenalin, rifamisin sodyum, dekspantenol, mepiramin maleat, flukortolon pivalat, klorheksidin glukonat, tribenosid, metamizol, Vitamin B1-B6-B12, çinko oksit, glukozamin sülfat, tinidazol, noradrenalin hidrojentartarat monohidrat, makrogollaurileter, mayıs papatyası (*Matricaria chamomilla*) tentürü, polioksi lauril eter; polioksietilendodesileter, prilokain, metronidazol; mikonazol nitrat, nimesulid, tiyokonazol, naproksen, tribenosid ve gümüş sülfadiazin ile kombinasyonları mevcuttur. Lidokain jel, krem, flaster, pomad, vajinal tablet, ovül, spozituvar, sprej dozaj formlarında ve enjektabl preparatlarda kullanılmıştır (Rx media pharma 2018).

1.8. Kollajen, Kitozan, Allantoin ve Lidokain HCl'nin Yara Örtülerinde Kullanılmaları

Son yıllarda yara örtüleri alanında yapılan çalışmalarda kollajen ve kitozan yara iyileşmesine olan katkılarının da etkisiyle sıklıkla kullanılan polimerik materyallerdendir. Kitozan ile mikroporöz kitozan-Ag/ZnO kompozit örtülerde yapılan çalışmada, süngerimsi kitozan tabaka içerisine nano boyutta Ag/ZnO yüklenmiştir. Elde edilen bulgulara göre yara örtüsünün antibakteriyel etkisi olduğu ve çok düşük toksisite gösterdiği saptanmıştır, yara örtüsü yara iyileşmesini hızlandırmıştır ve re-epitelizasyonu artırmıştır (Lu ve ark., 2017). Başka bir çalışmada çift tabakalı kitozan formülasyonları hazırlanmış ve üçüncü derece yanıklarda formülasyonun etkinliği araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada ilk kitozan tabakası gaz giriş çıkışına izin veren ve iyi mekanik özelliklere sahip bir kitozan tabakası olarak tasarlanırken, ikinci tabaka yaranın geometrisine izin sağlayacak yumuşaklıkta ve esneklikte formüle edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre formülasyon in-vivo çalışmalarda iyi tolere edilmiştir ve iyi bir doku rejenerasyonu sağlanmıştır. Yeni oluşan dokuda damarlanma artmış ve çalışma sonunda iyileşen doku esneklik ve estetik olarak yara izi oluşmaması bakımından hiç yara oluşmamış bölgedeki dokuyla aynı görünüme kavuştuğu bildirilmiştir (Boucard ve ark., 2007). Tablo 2'de yapılan başka bir çalışmada bildirilen (Simões ve ark., 2018) kitozan içeren yara örtülerinin etkili oldukları bakteriler listelenmiştir.

Tablo 2. Kitozan içeren yara örtülerinin etkili oldukları bakteriler (Simões ve ark., 2018).

Dozaj formu	Kullanılan Materyal	Etkili Olduğu Bakteri	
Membran	Kitozan	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	
	Kitozan, Bakteriyel selüloz	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	
	Kitozan, Polipropilen, N-izopropil akrilamid, Kollajen	<i>S. aureus</i>	
	Kitozan, İpek lifi	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	
	Kitozan, Serisin	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>	
	Kitozan, Kitozan-Glukan	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	
	Kitozan, Aloe vera	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	
	Hidrojel	Kitozan, Agaroz	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
		Köpük	Kitozan, β -siklodekstrin polimer
	Kitozan, Polivinil alkol,		<i>E. coli</i>
Film	Kitozan, Polivinilpirolidon, Nanoselüloz	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	
	Kitozan, Hyalüronik asit	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	

Kollajen yara örtüsü ile ilgili çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir polimerdir. Kollajen ve selülozdan oluşan bir yara örtüsüne *Spilanthes acmella* bitkisinden ekstrakte edilmiş analjezik etkili spilanthol, süpek-kritik çözücü ile yüklenmiştir (da

Silva ve ark., 2018). Başka bir çalışmada Doksisisiklin ve kollajen yüklü nanofiber üç tabakalı yara örtüsünün etkinliği araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Tort ve ark., 2017). Diğer bir çalışmada farklı miktarlarda timol yüklü kollajen yara örtülerinin etkinliği araştırılmış ve timol ilavesinin bakterilerin kollajen yara örtüsü üzerinde biyofilm oluşturmalarını inhibe ettiği tespit edilmiştir (Michalska-Sionkowska ve ark., 2017). Kollajen ve hiyalüronik asitten oluşturulmuş köpük yapıda bir yara örtüsü epidermal büyüme faktörü ve vitamin C türevleri desteklenerek, tam kalınlıkta doku hasarlarına olan etkisi araştırılmıştır (Niiyama ve Kuroyanagi, 2014).

Literatürde kitozan ve kollajen karışımları ile ilgili yayınlar ve bunların yanı sıra (Shi ve ark., 2008), kitozan ya da kollajenin başka polimerlerle karışımlarına dair çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak aljinat-kitin/kitozan (Murakami ve ark., 2010), kitozan-kollajen-jelatin (Gorczyca ve ark., 2014), kitozan /Pluronic F127 (Romić ve ark., 2016), kollajen-PEG (Sargeant ve ark., 2012) verilebilir. Yapılan başka bir çalışmada kitozan-polivinil alkol (PVA) - fibroin ile süngerimsi yapıda skafoldlar oluşturulmuş ve dermal yaralara uygulanmıştır. Aynı çalışmada farklı kombinasyonlar denenerek iyileşmenin kitozan-PVA-fibroin < kitozan-fibroin ≤ fibroin < PVA-kitozan < kitozan filmleri şeklinde azaldığı bildirilmiştir (JH ve ark., 2000). Diğer bir çalışmada kitozan-kollajen-aljinat kombinasyonu gazlı bez ve sadece kitozan uygulanan bir tedavi ile kıyaslanarak üstün bulunmuştur (Xie ve ark., 2018). İnsülin yüklü kitozan nanopartiküller ile kaplı polikaprolakton ve kollajenden oluşan yara örtüsünün etkinliğinin değerlendirildiği başka bir çalışmada formülasyonun steril gazlı beze kıyasla daha etkili olduğu bildirilmiştir (Ehterami ve ark., 2018). Kitozan ve kollajenin birlikte formüle edildiği ve kitozan ve kollajenin ayrı ayrı kullanıldığı filmler ile yapılan karşılaştırmalı çalışmada yara alanının azalması karışım filmde %96,25, kollajen filmde %65, kitozan filmde ise %55 olarak ölçülmüştür. Bu oran kontrol grubu için %33,75 bulunmuştur (Ramasamy ve Shanmugam., 2015).

Lidokainin yara örtüsüne yüklenmiş olduğu çalışmalar mevcuttur. Bunlardan bir tanesinde, elektroçirime ile hazırlanan nanofibröz polimerik bir yapı iskelesinden lidokain ve mupirosin salım profilleri araştırılmıştır. İlk bir saat içinde lidokainin

%80'inin salındığı (ani salım) sonrasında salımın sabitlendiği görülmüştür (Thakur ve ark., 2008). Başka bir çalışmada çözünmeyen karboksimetilselüloz matriksi ile lidokain yüklenmiş yara örtüsü tasarlanmış olup, lidokainin %90'ının ilk 15 dakikada salındığı tespit edilmiştir (Vinklárková ve ark., 2017). Diğer bir çalışmada üç tabakalı yara örtüsü tasarlanmıştır. Deri ile temas eden tabaka makro-poröz polietilen tereftalat içermekte ve tabakadan lidokain salımı gerçekleşmektedir. İkinci ve üçüncü tabakalarda aljinat ve sentetik viskoz kullanılmış ve diklofenak yüklenmiştir. Lidokainin hızlı salımı, hastaya ilk müdahalede rahatlatıcı etki vermesi bakımından uygun bulunmuştur (Maver ve ark., 2017).

Literatürde allantoinin yara iyileşmesi için jel formülasyonlarında kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Silikon türevlerinin, heparin, gümüş sülfadiazin, dekspantenol gibi farklı etken maddelerin kullanıldığı allantoin içeren bu jel formülasyonlarının etkinlikleri sıçanlar üzerinde denenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Durmus ve ark., 2012; Temiz ve ark., 2009; Karagoz ve ark., 2009; Kim ve ark., 2012; Muangman 2011). Ek olarak içeriğinde allantoin, klorheksidin, dekspantenol bulunan kitozan jel formülasyonu (Madrado-Jiménez ve ark., 2016) ve allantoinin yanında taurin içeren başka bir kitozan jel formülasyonu da (Alexandrovich ve ark., 2017) geliştirilmiş olup, yara iyileşmesini hızlandırdıkları ve iyileştirdikleri bildirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Araç ve Gereçler

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Allantoin- Sanovel İlaç, Türkiye (hediye)

Lidokain HCl- Sanovel İlaç, Türkiye (hediye)

Kitozan (Molekül ağırlığı 100.000-300.000)- Acros Organics, ABD

Kollajen (Collagen from bovine achilles tendon)- Sigma, Almanya

Asetonitril-Merck, Almanya

Glasiyel Asetik Asit- Riedel, Almanya

Sodyum Hidroksit- Riedel, Almanya

Potasyum dihidrojen fosfat- Merck, Almanya

Sodyum klorid- Merck, Almanya

Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat- Merck, Almanya

Fosforik Asit- JT Baker, ABD

Titrasyon ajanı (Karl Fischer-Hydranal/Composite 5)-Honeywell, ABD

DMEM- Sigma-Aldrich, ABD

Fetal Sığır Serumumu (FBS)- Gibco, İngiltere

Penisilin, Streptomisin- Sigma, ABD

L-glutamine- Biological Industries, ABD

Tripsin/0.02 EDTA- Thermo Fisher Scientific, İngiltere

Dimetilsülfoksit (DMSO)- Sigma Aldrich, ABD

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT)- Sigma Aldrich, ABD

2.1.2. Kullanılan araç ve gereçler

Hassas terazi- Mettler Toledo / MX5, Mettler Toledo / AX205, Mettler Toledo / AX504, Mettler Toledo / XP56, ABD

Dijital kumpas- Mitutoyo / CD-15CPX, Almanya

Manyetik karıştırıcı- Heidolph / MR Hei-end, Almanya

Isıticılı karıştırıcı- GFL / Shaker water bath, Almanya

Potansiyometrik titratör- Metrohm / 905 Titrand, İsviçre

Ultrasonik banyo- Bandelin Sonorex / RK 514, Almanya

Çalkalayıcı- IKA Shaker / Hs501D, ABD

HPLC Sistemi- WATERS Acquity, ABD

HPLC Sistemi- Agilent HP, ABD

Santrifüj cihazı- Sigma 2-16, İngiltere

pH metre- Mettler Toledo/Sevenexcellence, ABD

Etüv- Binder/FD240, Almanya

Buzdolabı- Bosch, Almanya

Mikropipet- Eppendorf (10-100 μ L, 100-1000 μ L, 500-5000 μ L), Almanya

Filtre- Chromafil/PET-45/25, Almanya

Karl Fischer cihazı- Methrom/901 Titrand, İsviçre

Erime noktası tayini cihazı- Mettler Toledo/FP90, ABD

Homojenizatör- Heidolph/SilentCrusher M, Almanya

FT-IR spektrometre- Perkin Elmer/Spectrum one, ABD

DSC- TAQ100, ABD

Işık mikroskobu- Olympus SZX7, Japonya

AFM- Ambient AFM/Nanomagnetics Instruments, Türkiye

AFM probu- Nanosensors, PPP-NCLR, İsviçre

Mikrokalorimetre (TAM IV)- TA Instruments, ABD

Laminar Hava Kabini- Telstar Biovanguard Class II, Japonya

CO₂, O₂ İnkibator - Panasonic, MCO-170M-PE, Japonya

Santrifüj- Hitachi CT15E, Japonya

Inverted Mikroskop- Nikon Eclipse Ts2, Japonya

Mikroplaka Okuyucu- BMG Spectrostar, Almanya

2.2. Yöntem ve Deneyler

2.2.1. Etken maddelerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

2.2.1.1. Allantoinin çözünürlüğünün incelenmesi

Etken maddenin fosfat tamponlu tuz çözeltisindeki (PBS, pH 7,4) çözünürlüğünün saptanabilmesi için allantoin hammaddesinden bir miktar alınarak kapaklı erlene aktarılmıştır. Üzerine seçilen ortamdan 25 mL eklenip ve çalkalayarak çözünmesi sağlanmıştır. Eklenen tüm hammadde çözüldüğünde, çözünmeyeceği duruma kadar hammadde eklenmeye devam edilmiştir ve doymuş koşul sağlanmıştır.

Numune önceden 37°C'ye ayarlanmış çalkalayıcı ısıtıcıya yerleştirilmiştir. Bu doymuş çözeltiden 20 mL'den daha fazla olacak şekilde alınan çözelti 0.45 µm PET filtre ile süzülmüştür. Süzüntüden pipet ile 20 mL alınmıştır. Distile su ile 40 mL'ye seyreltilmiştir (Allantoin Avrupa Farmakopesi miktar tayininde belirtilen potansiyometrik titrasyon yöntemi ışığında, tartım alınarak, 3mg/mL konsantrasyona yakın konsantrasyonda çözelti hazırlanması hedeflenmiştir). Sistemin dengeye ulaştığı andaki konsantrasyon değeri allantoinin çözünürlük değeri olarak saptanmıştır (EP 9.0 Allantoin Monograph).

2.2.1.2. Allantoinin erime noktasının tayini

Toz etken madde bir ucu kapalı kılcal cam boruya doldurularak aletin uygun bölümüne yerleştirilmiştir. Maddenin fiziksel değişim göstermeye başlayıp eridiği sıcaklık, termometreden okunarak saptanmıştır.

2.2.1.3. Allantoinin kurutma kaybı tayini

Yaklaşık 1 g kadar etken madde 105 °C etüvde ağırlığı sabitleninceye kadar kurutulmuştur (EP 9.0 Allantoin Monograph).

$$\%Kurutma\ kaybı = \frac{(son\ tartım-dara)-(ilk\ tartım-dara)}{ilk\ tartım-dara} \times 100$$

formülü ile hesaplama yapılmıştır (EP 9.0 2.2.32).

2.2.1.4. Allantoinin infrared (IR) spektrumunun incelenmesi

FT-IR spektrometre ile yapılan çalışma allantoinin ölçümünden oluşmaktadır. Yöntemde 4000 cm⁻¹ ile 650 cm⁻¹ arasındaki dalga boyu aralığı taranmıştır.

2.2.1.5. Lidokain HCl'nin çözünürlüğünün incelenmesi

Etken maddenin PBS tamponundaki (pH 7,4) çözünürlüğünün saptanabilmesi için kapaklı erlenlere konulan tampon çözeltisi üzerine lidokainin aşırısı konularak 37 °C'deki termostatlı çalkalayıcı su banyosu içinde karıştırılmıştır. Çeşitli zaman aralıklarında filtre yardımı ile alınan numunelerin konsantrasyonları önceden valide edilmiş HPLC metodu ile tespit edilmiştir. Sistemin dengeye ulaştığı andaki konsantrasyon değeri lidokainin çözünürlük değeri olarak saptanmıştır.

2.2.1.6. Lidokain HCl'nin erime noktasının tayini

Toz etken madde bir ucu kapalı kılcal cam boruya doldurularak aletin uygun bölümüne yerleştirilmiştir. Maddenin fiziksel değişim göstermeye başlayıp eridiği sıcaklık, termometreden okunarak saptanmıştır.

2.2.1.7. Lidokain'in su içeriğinin tayini

1.0 g lidokain HCl numunesinin su içeriği Karl Fischer cihazı ile tayin edilmiştir.

2.2.1.8. Lidokain HCl'nin infrared (IR) spektrumunun incelenmesi

FT-IR spektrometre ile yapılan çalışma lidokain HCl'nin ölçümünden oluşmaktadır. Yöntemde 4000 cm^{-1} ile 650 cm^{-1} arasındaki dalga boyu aralığı taranmıştır.

2.2.2. Polimerlerin özelliklerinin belirlenmesi

2.2.2.1 Kitozanın infrared (IR) spektrumunun incelenmesi

FT-IR spektrometre ile yapılan çalışma kitozanın ölçümünden oluşmaktadır. Yöntemde 4000 cm^{-1} ile 650 cm^{-1} arasındaki dalga boyu aralığı taranmıştır.

2.2.2.2. Kollajenin infrared (IR) spektrumunun incelenmesi

FT-IR spektrometre ile yapılan çalışma kollajenin ölçümünden oluşmaktadır. Yöntemde 4000 cm^{-1} ile 650 cm^{-1} arasındaki dalga boyu aralığı taranmıştır.

2.2.3. Formülasyon bileşenleri arası geçimlilik çalışması

Formülasyonda kullanılacak etken maddelerin arasında geçimsizlik olmadığını tespit etmek amacıyla, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), FT-IR spektrometre ve mikrok kalorimetre cihazları kullanılarak bir çalışma yapılmıştır.

2.2.3.1. Etken maddeler arası geçimliliğin DSC ile değerlendirilmesi

DSC ile yapılan çalışma allantoin, lidokain HCl ve kütlece eşit miktarda allantoin ve lidokain etken maddelerinden oluşan karışım tozlarının ölçümünden oluşmaktadır. Yöntem olarak $5\text{ }^{\circ}\text{C/dakika}$ ile $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılmış ve 80 ml/dakika azot gazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.2. Etken maddeler arası geçimliliğin FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi

FT-IR spektrometre ile yapılan çalışma allantoin, lidokain HCl ve kütlece eşit miktarda allantoin ve lidokain HCl etken maddelerinden oluşan karışım tozlarının ölçümünü kapsamaktadır. Ek olarak polimer ve etken maddeler arasındaki geçimliliği değerlendirebilmek adına kitozan, kollajen, allantoin ve lidokain HCl hammaddelerin oluşan toz karışımı da FT-IR ile çalışılmıştır. Yöntemde 4000 cm^{-1} ile 650 cm^{-1} arasındaki dalga boyu aralığı taranmıştır.

2.2.3.3. Etken maddeler arası geçimliliğin TAM-IV mikrokaloimetre ile değerlendirilmesi

İzotermal mikrokaloimetre olan TAM-IV (thermal activity monitor) ile yapılan çalışma, allantoin, lidokain HCl ve kütlece eşit miktarda allantoin ve lidokain HCl etken maddelerinden oluşan karışım tozlarının ölçümünden oluşmaktadır. 100 mg kadar tartılan numuneler 4 mL'lik cam ampullere yerleştirilmiştir. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dört gün boyunca veri toplanmıştır.

2.2.3.4. Polimerler ve etken maddeler arası geçimliliğin FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi

Formülasyonda kullanılacak polimerler ve etken maddeler arasındaki geçimliliği değerlendirebilmek adına kitozan-kollajen ve kitozan-kollajen-allantoin-lidokain HCl hammaddelerinden oluşan toz karışımları da FT-IR ile ölçülerek kıyaslanmıştır. Yöntemde 4000 cm^{-1} ile 650 cm^{-1} arasındaki dalga boyu aralığı taranmıştır.

2.2.4. Formülasyon çalışmaları

2.2.4.1. Önformülasyon çalışmaları

Etken madde yüklenmeden kitozan ve kollajenden oluşan skafoldların üretilmesi üzerine formülasyon çalışmalarına başlanmıştır. Bu aşamada skafold hazırlanmasına yönelik çalışmalar incelenmiştir.

Kollajen skafoldların hazırlanması için ilk olarak sığır aşil tendonundan elde edilen kollajen $0,5\text{ M}$ asetik asit çözeltisi içinde derişimi 1 mg/mL olacak şekilde

çözündürülmüştür. Bu halde kollajen çözeltide monomer halinde bulunacağından 1 M NaOH ile damla damla eklemek ve manyetik karıştırıcıda 1000 rpm hızda karıştırmaya devam etmek suretiyle nötralizasyonu yapılmıştır. Çözelti bu şekilde 8 saat oda sıcaklığında karıştırılmış ve gözlenmiştir. (Yuan ve ark., 2013; Ti ve ark., 2014; Ravindran ve ark., 2010).

Kollajen çözeltisi aynı yöntemle hazırlanarak karıştırma aşamasında 4 °C su banyosuna alınmıştır. Bu şekilde 1000 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bir başka yöntem olarak kollajen çözeltisi 4 °C'de 24 saat karıştırıldıktan sonra partikülleri süspande etmek amacıyla homojenizatör kullanılmıştır (Caliari ve ark., 2011).

Kitozan skafoldların hazırlanması için molekül ağırlığı 100.00-300.000 arasında olan toz halindeki kitozan tercih edilmiştir. Kitozan 0,5 M asetik asit çözeltisi içinde derişimi 1 mg/mL olacak şekilde çözündürülmüştür. Bu halde kitozan çözeltide monomer halinde bulunacağından 1 M NaOH ile damla damla eklemek ve manyetik karıştırıcıda 1000 rpm hızda karıştırmaya devam etmek suretiyle nötralizasyonu yapılmıştır. Çözelti bu şekilde 8 saat oda sıcaklığında karıştırılmış ve gözlenmiştir (Ti ve ark., 2014; Ravindran ve ark., 2010). Kitozan çözeltisi için nötralizasyon işlemi çözelti pH'sı sırasıyla 4,0, 6,0 ve 7,4 olacak şekilde damla damla 1 M NaOH eklenmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir (Humberto ve ark., 2015).

Kollajen/kitozan skafoldların hazırlanması için polimerler 0,5 M asetik asit çözeltisi içinde derişimi 1 mg/mL olacak şekilde çözündürülmüştür. Bu halde kollajen çözeltide monomer halinde bulunacağından 1 M NaOH ile damla damla eklemek ve manyetik karıştırıcıda 1000 rpm hızda karıştırmaya devam etmek suretiyle nötralizasyonu yapılmıştır. Çözeltilerin ayrı ayrı hazırlanmasında uygulanan yöntemler, 0,5 M asetik asitte birlikte çözünmesi sağlanmış polimer çözeltisinde de uygulanmış olup, çözeltilerin ayrı ayrı hazırlanıp istenilen hacimsel oranlarda karıştırılması ile son çözeltinin elde edildiği çalışmalar yapılmıştır (Yuan ve ark., 2013; Ti ve ark., 2014; Ravindran ve ark., 2010).

Bahsi geçen hazırlama yöntemleri 10 mg/mL polimer konsantrasyonu ile tekrar edilmiş olup 25 °C oda sıcaklığı, 60 °C etüv ve 30 °C etüv koşullarında 4 mL

polimer çözeltileri ortalama 10 mm² kadar alana sahip skafold kalıplarına dökülmüş çözeltilerin kuruma özellikleri gözlemlenmiştir. Ek olarak nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmeden polimer solüsyonları hazırlanarak değerlendirmeler yapılmıştır. Kitozan çözeltileri hazırlığında, kitozan hazırlığına göre uzun süren ve daha fazla zaman alan kollajen çözeltileri çözünme koşulu da denenmiş olup, üretimde iki polimer için tek çözelti hazırlığı değerlendirilmiştir.

Ön formülasyon çalışmalarında hazırlanan formülasyonlar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonları gösteren tablo

Formülasyon Numarası	Kollajen Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/mL)	Kitozan Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/mL)	Kitozan/Kollajen Oranı (h/h)	Kollajen Çözeltisi Karıştırma Süresi ve Sıcaklığı	Kitozan Çözeltisi Karıştırma Süresi ve Sıcaklığı	Kollajen Çözeltisi Nötralizasyon	Kitozan Çözeltisi Nötralizasyon	Homojenizatör kullanımı	Kurutma Sıcaklığı ve Kurutma Şekli	Kurutma süresi (saat)
F1	1	1	100/0	72 saat 25 °C	24 saat 25 °C	pH:7,4	pH:7,4	-	25 °C oda koşulu	72
	2		90/10							
	3		70/30							
	4		50/50							
	5		0/100							
F2	1	1	100/0	48 saat 4 °C	24 saat 25 °C	pH:7,4	pH:7,4	-	25 °C oda koşulu	72
	2		90/10							
	3		70/30							
	4		50/50							
	5		0/100							
F3	1	1	100/0	48 saat 4 °C	24 saat 25 °C	pH:7,4	pH:7,4	-	60 °C etüv	72
	2		90/10							
	3		70/30							
	4		50/50							
	5		0/100							
F4	1	1	100/0	48 saat 4 °C	24 saat 25 °C	pH:7,4	pH:7,4	-	30 °C etüv	24
	2		90/10							
	3		70/30							
	4		50/50							
	5		0/100							
F5	1	10	100/0	48 saat 4 °C	24 saat 25 °C	pH:7,4	pH:7,4	-	30 °C etüv	12
	2		90/10							
	3		70/30							
	4		50/50							
	5		0/100							

Tablo 3. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonları gösteren tablo (devam)

Formülasyon Numarası	Kollajen Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/mL)	Kitozan Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/mL)	Kitozan/Kollajen Oranı (h/h)	Kollajen Çözeltisi Karıştırma Süresi ve Sıcaklığı	Kitozan Çözeltisi Karıştırma Süresi ve Sıcaklığı	Kollajen Çözeltisi Nötralizasyon	Kitozan Çözeltisi Nötralizasyon	Homojenizatör kullanımı	Kurutma Sıcaklığı ve Kurutma Şekli	Kurutma süresi (saat)
F6	1	10	100/0	48 saat 4 °C	2 saat 25 °C	pH:7,4	pH:4,0	-	30 °C etüv	12
	2		90/10							
	3		70/30							
	4		50/50							
	5		0/100							
F7	1	10	100/0	24 saat 4 °C	2 saat 25 °C	pH:7,4	pH:6,0	Homojenizatör kullanıldı	30 °C etüv	12
	2		90/10							
	3		70/30							
	4		50/50							
	5		0/100							
F8	1	10	100/0	24 saat 4 °C	2 saat 25 °C	pH:6,0	pH:6,0	Homojenizatör kullanıldı	30 °C etüv	12
	2		90/10							
	3		70/30							
	4		50/50							
	5		0/100							
F9	1	10	100/0	24 saat 4 °C	2 saat 25 °C	Nötralizasyon yapılmadı	Nötralizasyon yapılmadı	Homojenizatör kullanıldı	30 °C etüv	12
	2		90/10							
	3		70/30							
	4		50/50							
	5		0/100							

2.2.4.2. Formülasyon çalışmaları

Karakterizasyon çalışmalarına, ön formülasyon çalışmaları ile optimize edilen ve Tablo 4' de verilmiş olan F10 numaralı formülasyon ile devam edilmiştir.

Tablo 4. Etken madde yüklenmemiş formülasyonlar

Formülasyon tablosu						
Formülasyon Numarası	Polimer (Kitozan-Kollajen) Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/mL)	Kitozan/Kollajen Oranı (a/a)	Kitozan-Kollajen Çözeltisi Karıştırma Süresi ve Sıcaklığı	Nötralizasyon	Homojenizatör kullanımı	Kurutma Süresi, Sıcaklığı ve Kurutma Şekli
F10-1	10	100/0	24 saat 4 °C	pH:6,0	Homojenizatör kullanıldı	12 saat, 30 °C etüv
F10-2		90/10				
F10-3		70/30				
F10-4		50/50				
F10-5		0/100				

2.2.4.2.1. Formülasyona etken maddelerin yüklenmesi

Allantoin ve lidokain HCl etken maddeleri polimerlerin 0,5 M asetik asitte çözündürülmesi aşamasında eklenmiş olup, 1000 rpm hızda manyetik karıştırıcı ile çözelti içinde çökelti görünmeyene kadar çözündürülmüştür. Yükleme dozu 100 mg polimere 5 mg allantoin ve 5 mg lidokain HCl tekabül edecek şekilde belirlenmiştir. Karakterizasyonu yapılmak üzere hazırlanan formülasyon Tablo 5' te verilmiştir.

Tablo 5. Etken madde yüklenmiş formülasyon tablosu

Formülasyon tablosu							
Formülasyon Numarası	Etken Madde Yükleme Miktarı (Polimer/ Her bir Etken Madde (a/a))	Polimer (Kitozan-Kollajen) Çözeltisi Konsantrasyonu (mg/mL)	Kitozan/Kollajen Oranı (a/a)	Kitozan-Kollajen Çözeltisi Karıştırma Süresi ve Sıcaklığı	Nötralizasyon	Homojenizatör kullanımı	Kurutma Süresi, Sıcaklığı ve Kurutma Şekli
F11-1	100/5	10	100/0	24 saat 4 °C	pH:6,0	Homojenizatör kullanıldı	12 saat, 30 °C etüv
F11-2			90/10				
F11-3			70/30				
F11-4			50/50				

2.2.5. Formülasyonun karakterizasyonu için yapılan çalışmalar

2.2.5.1. Etken madde yüklenmemiş skafoldların karakterizasyonu

2.2.5.1.1. Skafoldların kalınlıklarının tayini

Skafoldların kalınlığı Mitutoyo / CD-15CPX marka dijital kumpas kullanılarak ölçülmüştür. Skafoldlar en az 3 ayrı kenardan ölçülerek, ölçümlerin ortalaması alınmıştır. Her bir seri için test 3 kez tekrarlanmış ve değerlerin ortalaması hesaplanmıştır.

2.2.5.1.2. Skafoldların FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi

Formülasyonlar Perkin Elmer / Spectrum one marka FT-IR kullanılarak analiz edilmiştir. Yöntemde 4000 cm^{-1} ile 650 cm^{-1} arasındaki dalga boyu aralığı taranmıştır.

2.2.5.1.3. Skafoldların fiziksel görünümünün optik mikroskop ile değerlendirilmesi

Numune yüzeylerinde makroskobik değerlendirilmesi için dijital kameraya bağlanmış (Olympus C-5060) optik mikroskop (Olympus SZX7) kullanılmıştır.

2.2.5.1.4. Skafoldların atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterizasyonu

Çok yüksek çözünürlüklü bir taramalı kuvvet mikroskobu olan AFM, nano boyutta örneklerin yüksek çözünürlükte görüntülenmesi ve analizi en gelişmiş araçlardan biridir. Bu projede filmlerin 3 boyutlu (3B) topografik özellikleri AFM ile dinamik modda (tapping modu) karakterize edilmiştir.

Analizler için Ambient AFMTM (Nanomagnetics Instruments) kullanılmıştır. AFM görüntülemelerinde, PPP-NCLR problemleri kullanılmıştır. Bu problemlerin rezonans frekansı 146 – 236 kHz arasında, kuvvet sabiti ise 21 – 98 N/m arasındadır. Görüntüleme hızı 1-3 Hz olarak ayarlanmıştır. Görüntüler, Image Analyzer v1.5 (Nanomagnetics Instruments) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Çalışmada, her bir filmin en az 3 farklı bölgesi incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm görüntüler $5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$ boyutlarında alınmıştır. Görüntüleme öncesi filmler, yüzeydeki asetik asit kalıntılarını gidermek amacıyla distile su ile yıkanmış ve etüvde $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de kurutulmuştur.

2.2.5.1.5. Skafoldların şişme özelliklerinin değerlendirilmesi

PBS tamponu (pH:7,4) ile 25 °C (oda sıcaklığı) koşulunda çalışılmıştır. Her birine 10 mL PBS ilave edilen kapaklı erlenlere yaklaşık eşit boyutlarda ve ağırlıkta olacak şekilde kare şeklinde skafoldlar kesilerek konulmuş ve inkübasyona bırakılmıştır. Belirli periyotlarda erlenlerden çıkarılan skafoldların fazla suları süzgeç kağıdına emdirilmiş ve tartım alınmıştır. Bu tartımlar şişme verilerinin hesaplanabilmesi için kayıt edilmiştir (Ti ve ark., 2014).

Elde edilen sonuçlar, kuru haldeki filmler ile aşağıdaki eşitlik kullanılarak karşılaştırılmıştır:

$$\text{ŞM} = \frac{\text{Wt}(e) - \text{Wt}(i)}{\text{Wt}(i)} \times 100$$

Burada ŞM, filmlerdeki şişme miktarı, Wt(i), filmin kuru haldeki ağırlığı, Wt(e) ise filmin denge haline gelinceye kadar şişmesi sonrası bulunan ağırlığıdır. Bu testte kullanılan örneklerin aynı kalınlıkta olmasına dikkat edilmiştir (Sargeant ve ark., 2012).

2.2.5.1.6. Skafoldların hidrolitik degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesi

PBS Tamponu (pH:7,4) hazırlanmıştır. Su banyosu 37 °C'ye ısıtılmıştır. Her birine 10 mL PBS ilave edilen ve 37 °C'ye ısıtılan kapaklı erlenlere yaklaşık eşit boyutlarda ve kare şeklinde skafoldlar kesilerek konulmuş ve inkübasyona bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarında erlenlerden çıkarılan skafoldlar distile su ile yıkanmıştır. Fazla suları süzgeç kağıdına emdirilmiştir. 24 saat çeker ocakta kurutulan skafoldlar tekrar tartılmıştır. Bu tartımlar da degradasyon verilerinin hesaplanması için kayıt edilmiştir (Sargeant ve ark., 2012).

2.2.5.1.7. Skafoldların *in-vitro* kollajenaz degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesi

PBS tamponu (pH:7,4) hazırlanmıştır. Su banyosu 37 °C'ye ısıtılmıştır. Her birine 60 µl kadar 1 mg/mL konsantrasyonuna sahip kollajenaz solüsyonu içeren 5 mL PBS ilave edilen ve 37 °C'ye ısıtılan kapaklı erlenlere yaklaşık eşit ağırlıkta ve boyutlarda kare şeklinde skafoldlar kesilerek konulmuştur. Skafoldlar bu şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Belirli zaman aralıklarında erlenlerden çıkarılan skafoldlar distile su ile yıkanmıştır. Skafoldların fazla suları süzgeç kağıdına emdirilmiştir. Çeker ocakta kurutulan skafoldlar tekrar tartılmıştır. Bu tartımlar da degradasyon verilerinin hesaplanması için kayıt edilmiştir. Son ağırlıklar ilk ağırlıklara oranlanmıştır (Ti ve ark., 2014).

2.2.5.2. Etken madde yüklenmiş skafoldların karakterizasyonu

2.2.5.2.1. Skafoldların FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi

Formülasyonlar FT-IR ile ölçülerek kıyaslanmıştır. Yöntemde 4000 cm⁻¹ ile 650 cm⁻¹ arasındaki dalga boyu aralığı taranmıştır.

2.2.5.2.2. Skafoldlara ilaç yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi

Allantoin ve lidokain HCl yüklenmiş skafoldlarda yükleme dozunun saptanabilmesi için 10 mg allantoin ve 10 mg lidokain HCl yüklenmiş kitozan-kollajen skafold alınmıştır. Skafold kesilerek küçük parçalar haline getirilmiştir. Parçaların tamamı 10 mL'lik balon jøjeye aktarılmıştır. Üzerine birkaç damla glasiyel asetik asit damlatılmıştır. Balon jøjede, aşağıda bileşimi verilen seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmıştır. ~60 dakika çalkalayıcıda karıştırılmıştır. 7800 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi yapıldıktan sonra HPLC örnek şişesine alınmış ve enjeksiyona hazırlanmıştır.

Allantoin ve lidokain HCl standart çözeltisi: ~ 50 mg allantoin ve ~ 50 mg lidokain HCl, 50 mL'lik balon jøjeye tartılmıştır. Seyreltme çözeltisi ile hacmine tamamlanmıştır. 20 dakika 650 devirde manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Hesaplamalar aşağıdaki eşitlik kullanılarak yapılmıştır.

Standart çözeltisi konsantrasyonu (C_{Std}) hesabı (USP <621> Chromatography):

$$C_{Std} (\text{Allantoin/Lidokain}) = \left[\frac{W_{Std}}{V} \times \text{Potens} \times \text{Seyreltme Faktörü} \right]$$

W_{Std} = Standart tartımı (mg)

Potens = Allantoin çalışma standardının potensi (as-is değeri üzerinden)

V = Hacim

$$\text{Miktar tayini (mg Allantoin-Lidokain)} = \left[\frac{(A_{Test} / A_{Std}) \times C_{Std}}{W_{Test} / V} \right] \times W_{Ort}$$

A_{Test} = Test çözeltisinden elde edilen kromatogramdaki Allantoin/Lidokain pik alanı

A_{Std} = Standart çözeltisinden elde edilen kromatogramdaki Allantoin/Lidokain pik alanı

C_{Std} = Standart çözeltisinde Allantoin/Lidokain konsantrasyonu (mg/mL)

W_{Test} = Skafolda yüklenmek üzere tartılan etken madde ağırlığı (mg)

V = Seyreltme hacmi

W_{Ort} = Skafoldta bulunan teorik etken madde miktarı

2.2.5.2.3. Analitik yöntem validasyonu

Valide edilecek analitik yöntemlerin performans parametreleri USP<1225> Validation of Compendial Methods, ICH Q2R1 Validation of Analytical Procedures; Text and Methodology rehberlerinde belirtilmiştir.

Kromatografik koşullar ve hareketli faz ve seyreltme çözeltileri hazırlıkları aşağıdaki gibidir:

Kromatografik Koşullar

Kolon : Inertsil ODS-4, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m

Akış hızı : 1 ml / dak.

Tayin dalgaboyu : UV, 220 nm

Enjeksiyon hacmi : 5 μ L

Kolon sıcaklığı : 40 °C

Tray sıcaklığı : 25 °C

Analiz süresi :12 dakika

Hareketli faz çözeltisi hazırlığı: 6,8 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) 980 mL suda çözülür. 1 M fosforik asit (H_3PO_4) ile pH 3,0'a ayarlanır ve distile su ile 1 L'ye tamamlanır. Karışım, 0.2 μ m membran filtreden süzülerek bir süre degaze edilir. Hazırlanan bu tampon ACN (Asetonitril) ile 80:20 oranında karıştırılır.

Seyreltme çözeltisi hazırlığı: PBS ortamı: 2,3 g disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat, 0,19 g potasyum dihidrojen fosfat ve 8 g sodyum klorid tartılır ve 1000 mL'ye distile su ile tamamlanır. Çözeltinin pH'sı fosforik asit ile 7,4'e ayarlanır.

2.2.5.2.3.1. Spesifiklik

2.2.5.2.3.1.1. Pik tanımlaması, blank ve plasebo etkisi

Spesifiklik kapsamında, analiz edilecek maddenin matris etkisini ve katkı maddelerini de içeren halde, ürün içinde kesin olarak tayin edilebilirliği ölçülür. Analizi gerçekleştirilen kör çözelti (blank çözeltisi), plasebo çözeltisi, referans çözelti (standart çözeltisi) ve test çözeltisinden elde edilen kromatogramlar değerlendirilir ve pikler belirlenir. Bu kapsamda çözücü ve plasebo kromatogramında etken madde alıkonma zamanında gelen herhangi bir pik gözlenmemelidir. Etken madde piki saf olmalıdır (Purity angle < Purity threshold).

2.2.5.2.3.1.2. Taşınma etkisi

Taşınma (carry-over), metot geliştirme çalışmaları sırasında tanımlanmalı ve minimize edilmelidir. Validasyon esnasında taşınma etkisi, test çözeltisinin ardından enjekte edilen blank çözeltileri ile tayin edilir. Standart çözeltisinden 6 adet vial hazırlanmıştır. Her standart çözeltisi enjeksiyonunun ardından blank çözeltisi enjekte edilerek taşınma (carry-over) miktarına bakılmıştır (6 adet standart çözeltisi enjeksiyonu ve 6 adet blank çözeltisi enjeksiyonu olacak şekilde çalışma gerçekleştirilmiştir). Bu kapsamda blank enjeksiyonundaki taşınma (carry-over) etken maddenin alan olarak % 1'ini geçmemelidir.

2.2.5.2.3.2. Sistem uygunluk

Sistem uygunluğu testleri, analitik yöntemlerin doğru ve kesin sonuçlar vermesine katkıda bulunan spesifik testlerdir. Sistem uygunluk testi, birçok analitik metodun ana testlerinden birisidir. Bu testlerin prosedürleri, ekipmana, uygulanan test prosedürlerine ve analiz edilecek maddeye bağlı olarak hazırlanmalı ve değerlendirilmelidir. Sistem uygunluk test parametreleri, analiz edilecek maddenin yapısına, valide edilen analitik yöntemeye bağlı olarak hazırlanmalı ve değerlendirilmelidir. Analiz yönteminde tarif edildiği şekilde standart çözeltisi hazırlanmıştır ve peş peşe 6 enjeksiyon yapılmıştır. Her enjeksiyona ait alan değerleri belirlenmiştir. Sonuçların ortalaması, standart sapma (SS) ve rölatif standart sapma (RSS) hesaplanmıştır. Altı ardışık enjeksiyon için RSS değeri % 2,0'dan büyük olmamalıdır.

2.2.5.2.3.3. Tespit limiti (LOD, Limit of detection)

Örnekteki bileşenin doğru ve güvenilir şekilde teşhis edilebilen en düşük konsantrasyonudur. Bu miktarın gerçek değer olarak belirlenmesi gerekmez. Düşük konsantrasyonlarda allantoin ve lidokain HCl içeren çözelti hazırlanarak 3 adet enjeksiyon yapılmıştır ve sinyal / gürültü

oranı $\geq 3,0$ olan çözelti konsantrasyonu tespit seviyesi olarak belirlenmiştir. Örnek kromatogramında elde edilen sinyalin, blank kromatogramındaki gürültüye oranının en az 3,0 olması gerekmektedir (sinyal / gürültü $\geq 3,0$).

2.2.5.2.3.4. Hesaplanabilirlik limiti (LOQ, Limit of quantitation)

Örnekteki bileşenin doğru ve güvenilir şekilde hesaplanabilen en düşük konsantrasyonudur. Düşük konsantrasyonlarda allantoin ve lidokain HCl içeren çözelti hazırlanarak 6 kez enjekte edilmiştir ve sinyal / gürültü oranı $\geq 10,0$ olan çözelti konsantrasyonu hesaplanabilirlik seviyesi olarak belirlenmiştir. Test kromatogramında elde edilen sinyalin blank kromatogramındaki gürültüye oranının en az 10,0 olması gerekmektedir (sinyal/gürültü $\geq 10,0$).

2.2.5.2.3.5. Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı demek, belirlenen aralıkta elde edilen test sonuçlarının numune içindeki etken madde konsantrasyonu ile doğru orantıya sahip olmasıdır. Çalışma derişiminin % 70 ile % 120 seviyesi aralığında olacak şekilde, 5 ayrı konsantrasyonda standart çözeltisi hazırlanarak analiz edilmiş ve dedektör yanıtına göre derişim / alan grafiğı çizilerek kabul kriterine uygunluğu test edilmiştir. Standart stok çözeltisinden seyreltilerek hazırlanan farklı konsantrasyondaki allantoin ve lidokain HCl içeren çözeltilerin HPLC sistemindeki alanlarından hareketle standart eğrisi ve denklemleri oluşturulmuştur.

Standart Stok Çözeltisi: Allantoin ve Lidokain çalışma standardından ayrı ayrı 50'şer mg 25 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır. Seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmıştır. ~20 dakika 650 devirde manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

($C_{Allantoin} = 2,0 \text{ mg/mL}$ $C_{Lidokain} = 2,0 \text{ mg/mL}$)

Standart çözelti 1 (% 70'lık): Standart stok çözeltisinden 3,5 mL pipet ile alınıp, 10 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır. Standart çözeltisi, 0,45 μm filtreden süzülerek HPLC örnek şişesine alınmış ve enjeksiyona hazırlanmıştır.

($C_{Allantoin} = 0,7 \text{ mg/mL}$ $C_{Lidokain} = 0,7 \text{ mg/mL}$)

Standart çözelti 2 (% 80'lik): Standart stok çözeltisinden 4.0 mL pipet ile alınmış, 10 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır.

Standart çözeltisi, 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC örnek şişesine alınmış ve enjeksiyona hazırlanmıştır.

(C_{Allantoin}= 0,8 mg/mL C_{Lidokain} = 0,8 mg/mL)

Standart çözelti 3 (% 90'lık): Standart stok çözeltisinden 4,5 mL pipet ile alınmış, 10 mL'lik balon jøjeye aktarılmıştır. Seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır. Standart çözeltisi, 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC örnek şişesine alınmış ve enjeksiyona hazırlanmıştır.

(C_{Allantoin}= 0,9 mg/mL C_{Lidokain} = 0,9 mg/mL)

Standart çözelti 4 (% 100'lik): Standart stok çözeltisinden 5,0 mL pipet ile alınmış, 10 mL'lik balon jøjeye aktarılmıştır. Seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır. Standart çözeltisi, 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC örnek şişesine alınmış ve enjeksiyona hazırlanmıştır.

(C_{Allantoin}= 1,0 mg/mL C_{Lidokain} = 1,0 mg/mL)

Standart çözelti 5 (% 120'lik): Standart stok çözeltisinden 3,0 mL pipet ile alınmış, 5 mL'lik balon jøjeye aktarılmıştır. Seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmış ve çalkalanmıştır. Standart çözeltisi, 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC örnek şişesine alınmış ve enjeksiyona hazırlanmıştır.

(C_{Allantoin}= 1,2 mg/mL C_{Lidokain}= 1,2 mg/mL)

Bu kapsamda;

$$R^2 \geq 0.996$$

$$\text{Relatif rezidüel standart sapma} = \frac{\text{Rezidüel Standart Sapma}}{\%100'lük Standart Alanı} \times 100 \leq \% 3,0$$

$$\frac{Y_{\text{kesim}}}{\%100'lük Std alanı} \times 100 \leq \% 2,0$$

şartları sağlanmalıdır.

Burada rezidüel kavramı, öngörülen ile gözlenen değer arasındaki farkı tanımlamaktadır. Y_{kesim} ise elde edilen doğrunun y eksenini kestiği noktayı ifade etmektedir.

2.2.5.2.3.6. Uygulama aralığı

Bir analitik yöntemin aralığı doğruluk çalışmalarıyla oluşturulur. Uygun doğruluk, doğruluk ve kesinliğe sahip bir yöntem ile tayin edilen bileşenin alt ve üst konsantrasyonları arasındaki aralık olarak tarif edilir. Doğruluk çalışmasının alt ve üst derişimindeki (% 70 ile % 120) çözeltilerden 6 defa enjeksiyon yapılmış ve kabul kriterine uygunluğu kontrol edilmiştir. Bu kapsamda $RSS \leq \% 2,0$ olmalıdır.

2.2.5.2.3.7. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik

Analitik yöntemin doğruluğu, örnek içindeki analizi yapılacak olan maddenin derişimi ile analiz neticesi bulunan derişiminin birbiriyle uygunluğu olarak ifade edilir. Çalışma konsantrasyonunun % 70, % 100 ve % 130'unu içeren üç tane paralel numune hazırlanıp analiz edilmiş ve kabul kriterlerine uygun olup olmadığı kontrol edilmiştir. Tek tek sonuçlar, SS ve RSS hesaplanmıştır.

Test çözeltisi (% 70'lik seviye): ~7 mg allantoin ve ~7 mg lidokain HCl standardı ve ~ 200 mg allantoin ve lidokain HCl içermeyen skafold plasebosu 10 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır. Üzerine birkaç damla glasiyel asetik asit damlatılmıştır. Seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmıştır. ~60 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 7800 rpmde 15 dk santrifüj işlemi yapıldıktan sonra HPLC örnek şişesine alınmış ve enjeksiyona hazırlanmıştır.

($C_{Allantoin} = 0,7 \text{ mg/mL}$ $C_{Lidokain} = 0,7 \text{ mg/mL}$)

Test çözeltisi (% 100'lük seviye): ~10 mg allantoin ve ~10 mg lidokain HCl standardı ve ~ 200 mg allantoin ve lidokain HCl içermeyen skafold plasebosu 10 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır. Üzerine birkaç damla glasiyel asetik asit damlatılmıştır. Seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmıştır. ~60 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 7800 rpmde 15 dk santrifüj işlemi yapıldıktan sonra HPLC örnek şişesine alınmış ve enjeksiyona hazırlanmıştır.

($C_{Allantoin} = 1,0 \text{ mg/mL}$ $C_{Lidokain} = 1,0 \text{ mg/mL}$)

Test çözeltisi (% 130'lük seviye): ~13 mg allantoin ve ~13 mg lidokain HCl standardı ve ~ 200 mg allantoin ve lidokain HCl içermeyen skafold plasebosu 10 mL'lik balon jöjeye tartılmıştır. Üzerine birkaç damla glasiyel asetik asit damlatılmıştır. Seyreltme çözeltisiyle hacmine tamamlanmıştır. ~60 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 7800 rpmde 15 dk santrifüj işlemi yapıldıktan sonra HPLC örnek şişesine alınmış ve enjeksiyona hazırlanmıştır.

(C_{Allantoin} = 1,3 mg/mL C_{Lidokain} = 1,3 mg/mL)

Bu kapsamda her bir seviye için allantoin ve lidokain HCl geri kazanımı % 97,0 - % 103,0 arasında olmalıdır. Her bir seviye için elde edilen geri kazanımların ortalama, SS ve RSS değerleri raporlanmalıdır.

2.2.5.2.3.8. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, homojen haldeki tek örnekten yapılan ardışık numunelemelerden elde edilmiş ölçüm serilerinin uygunluk yakınlığı (saçınım derecesi) olarak ifade edilir. Kesinlik parametresi, homojen numune ile yapılmalıdır. Eğer homojen numune bulunamıyorsa suni olarak hazırlanmalıdır.

2.2.5.2.3.8.1. Sistem kesinliği (tekrar edilebilirlik)

Sistem kesinliği aynı çalışma şartları altında ve kısa zaman dilimi içinde uygulanır. Sistem kesinliği, numune hazırlığı kaynaklı ortaya çıkabilecek hatalardan ayrı olarak sistemin performansının ölçülmesine dayalı bir parametredir. Analiz yönteminde tarif edildiği şekilde standart çözeltisi hazırlanmış ve peş peşe 6 enjeksiyon yapılmıştır. Her enjeksiyona ait alan değerleri belirlenmiştir. Sonuçların ortalaması, standart sapma (SS) ve rölatif standart sapma (RSS) hesaplanmıştır. Bu kapsamda altı ardışık enjeksiyon için RSS değeri % 2,0'dan büyük olmamalıdır.

2.2.5.2.3.8.2. Yöntem kesinliği (tekrar elde edilebilirlik)

Yöntem kesinliği, aynı çalışma şartları altında kısa zaman dilimi içinde uygulanır. Sistem performansının örnek hazırlama safhası kaynaklı hataların da dahil edilerek değerlendirilmesidir. Allantoin 5 mg lidokain HCl 5 mg kitozan-kollajen skafold farmasötik ürünü kullanılarak yöntemde belirtildiği şekilde, 3 farklı miktar tayini numunesi analiz edilmiş ve kabul kriterlerine uygunluğu test edilmiştir. Bu kapsamda sonuçlar spesifikasyon dışı olmamalıdır. RSS ≤ % 2,0 olmalıdır.

2.2.5.2.3.9. Sağlamlık

2.2.5.2.3.9.1. Çözelti stabilitesi

Analizi yapılacak maddenin stabil halde analiz şartları altında bekletilebileceği sürenin saptanmasıdır. Tercih edilen bekletilme süresi analize göre değişir. Eğer etken maddenin bekletilen süre ve saklama şartında bozulması halinde bu şartlar limit olarak yöntemde

bildirilir. Standart ve test çözeltisi yöntemine göre hazırlanmış ve en az 48 saat boyunca 25 °C sıcaklıkta bekletilip belli sürelerde analiz edilmiştir. Bu kapsamda belirtilen stabilite süresi boyunca, referans ve test çözeltisi analiz sonuçlarının başlangıç değerlerine göre yüzde değişim oranı 2,0'dan fazla olmamalıdır.

2.2.5.2.4. Skafoldların etken madde salım özelliklerinin değerlendirilmesi

Skafoldların *in-vitro* salım çalışmaları, ısıtıcılı çalkalayıcı ile 37 °C'de PBS tamponunda (pH 7,4) yapılmıştır. Çalışmalar dört farklı formülasyonda ve her bir formülasyon için üç paralel olacak şekilde yürütülmüştür. Tartılan skafoldlar, dissolüsyon cihazına yerleştirilmiştir. Önceden belirlenen zaman aralıklarında numuneler alınmıştır ve sink koşulları devam ettirmek amacıyla, ortama alınan miktar kadar PBS tamponu ilave edilmiştir. Bu verilerden hareketle ortalama, standart sapma hesaplanmıştır.

Alınan numuneler HPLC analiz edilmiştir. Skafoldların ilaç salım özellikleri ve ilaç serbestleştirme mekanizmaları değerlendirilmiştir.

Hesaplama aşamasında öncelikle 1 mL'lik numunelerin HPLC ile miktar tayini sonuçları kaydedilmiştir. Bu sonuçlar elde edilirken yukarıda bahsi geçen eşitlik kullanılmıştır. 1. saatten sonraki sonuçlar, PBS ile tamamlama işlemi yapıldığı için, kümülatif sonuç olacak şekilde yeniden hesaplanmıştır. En son aşamada elde edilen miktarlar, skafoldları hazırlanması aşamasında formülasyona konulan miktarlara oranlanarak yüzde sonuç bulunmuştur. Paralellerin ortalamaları, SS ve RSS hesaplamaları yapıldıktan sonra yüzde grafik çizilmiştir.

Skafoldlardan etken madde salım kinetikleri, Kinet DS programı kullanılarak belirlenmiştir.

2.2.5.2.5. Skafoldların fiziksel görünümünün optik mikroskop ile değerlendirilmesi

Numune yüzeylerinde makroskobik değerlendirilmesi için dijital kameraya bağlanmış (Olympus C-5060) optik mikroskop (Olympus SZX7) kullanılmıştır.

2.2.5.2.6. Skafoldların atomik kuvvet mikroskobu ile karakterizasyonu

Çok yüksek çözünürlüklü bir taramalı kuvvet mikroskobu olan AFM, nano boyutta örneklerin yüksek çözünürlükte görüntülenmesi ve analizi en gelişmiş araçlardan biridir. Bu projede filmlerin 3 boyutlu (3B) topografik özellikleri AFM ile dinamik modda (tapping modu) karakterize edilmiştir.

Analizler için Ambient AFM™ (Nanomagnetics Instruments) kullanılmıştır. AFM görüntülemelerinde, PPP-NCLR problemleri kullanılmıştır. Bu problemlerin rezonans frekansı 146 – 236 kHz arasında, kuvvet sabiti ise 21 – 98 N/m arasındadır. Görüntülemelerde tarama hızı 1-3 Hz olarak ayarlanmıştır. Görüntüler, Image Analyzer v1.5 (Nanomagnetics Instruments) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Çalışmada, her bir filmin en az 3 farklı bölgesi incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm görüntüler 5 µm x 5 µm boyutlarında alınmıştır. Görüntüleme öncesi filmler, yüzeydeki asetik asit kalıntılarını gidermek amacıyla distile su ile yıkanmış ve etüvde 30 °C’de kurutulmuştur.

2.2.6. Stabilite çalışması

%50 kitozan %50 kollajen polimerlerinden oluşan allantoin ve lidokain HCl yüklenmiş 3 adet skafold numunesi 3 ay süre ile stabilite kabini 25 °C ± 2°C / % 60 bağıl nem ± %5 bağıl nem koşulunda alüminyum blister folyo içinde bekletilmiştir. Stabilite kabiniinden çıkarılan numunelerde validasyonu tamamlanmış HPLC yöntemi ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Numunelerin görsel kontrolleri de yapılmıştır (ICH Q1A2).

2.2.7. Hücre kültürü çalışmaları

2.2.7.1. Hücre kültürü

Çalışma kapsamında göbek kordonundan elde edilen MKH kullanıldı. MKH kültür ortamı olarak; %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 L-glutamine içeren DMEM ortamında 37 °C’de %5 CO₂’li ortamda 75 cm²’lik kültür kabında inkübe edildi. Kültür ortamı iki günde bir değiştirildi. MKH’ler %80 yoğunluğa ulaştığında %0,05 Trypsin/0,02 EDTA solüsyonu ile kültür kabından ayrıldı. Takiben, DMEM ile süspansiyon edilerek 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Medium, pipet yardımıyla atıldıktan sonra hücreler DMEM ile süspansiyon edildi ve thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. Tez kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda kullanılan MKH’lerin pasaj numaraları 6’dır (Alavarse ve ark., 2017).

2.2.7.2. MTT analizi

MTT analizi için örneklerin her iki tarafı 30 dakika UV ışığı altında sterilize edildi. Steril örneklerin üzerine 1 cm²/mL oranı ile MKH kültür ortamı ilave edilerek 24 saat 37 °C’de %5 CO₂’li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra örneklerin bulunduğu MKH kültür ortamı aynı miktarda DMEM ile seyreltildi. MKH’ler, 48 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekildi. Üzerine kuyucuk başına 300 µl DMEM eklendi ve 1

gece 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklardaki besiyeri membranlarla muamele edilmiş hücre kültür besiyeriyle değiştirilerek 24 saat ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuk başına 300 µl DMEM ve 30 µl MTT solüsyonu (20 µg/ml, PBS ile seyreltilerek) eklendi ve 4 saat daha inkübe edildi. İşlemin devamında, ortamdaki hücre kültür besiyeri 300 µl DMSO ile değiştirildi ve 20 dakikalık bir inkübasyondan sonra mikropilaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de okundu (Alavarse ve ark., 2017).

3. BULGULAR

3.1. Etken Maddelerin Fizikokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

3.1.1. Allantoininin çözünürlük tayini

Allantoinin Bölüm 2.2.1.1'de anlatıldığı şekilde saptanan pH 7,4 PBS tamponu içindeki çözünürlük değeri 11,583 mg/ml olarak bulunmuştur Sonuçlar Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Allantoin Hidroklorür çözünürlük değerleri

Allantoinin Çözünürlük Değeri (mg/ml)	SS	RSS	N*
11,583	0,244	2,106	3

*: Paralel sayısı

3.1.2. Allantoinin erime noktası tayini

Allantoinin erime noktası tayini 3 paralel ölçümün sonucu alınarak bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. EP 9.0'da allantoinin 225 °C'de eridiği belirtilmiştir. Deney sonucunda maddenin 225 °C'de eridiği görülmüştür, bu değer literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur (EP 9.0 Allantoin Monograph).

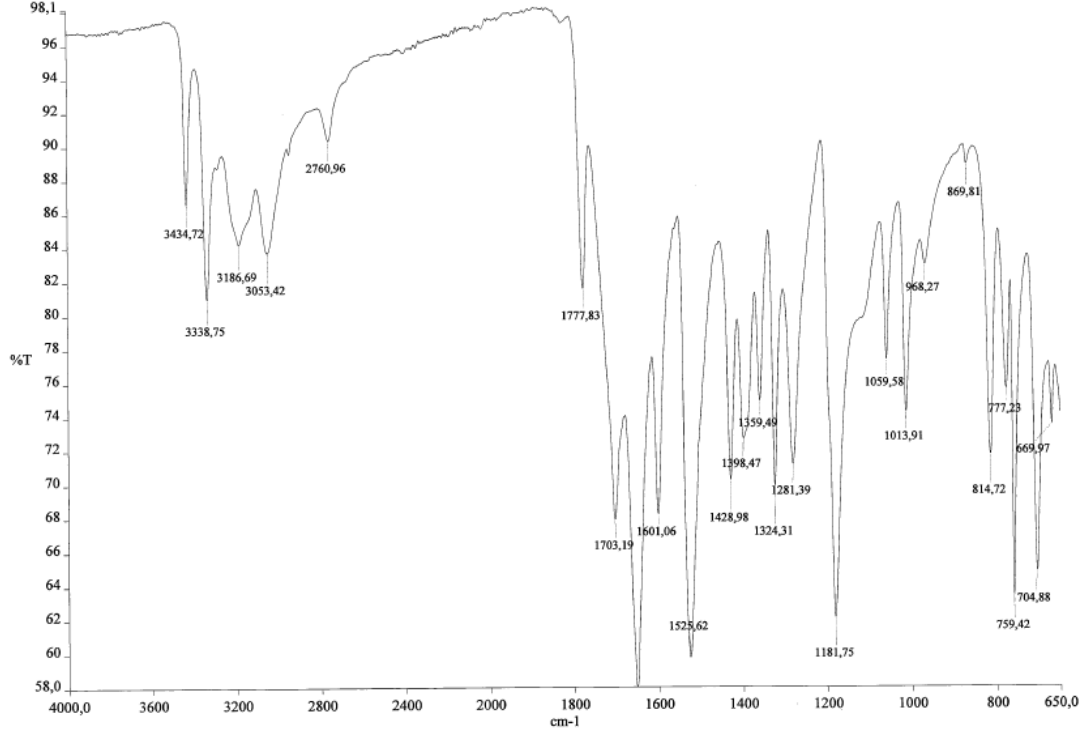
3.1.3. Allantoinin kurutma kaybı tayini

Allantoinin kurutma kaybı tayini 3 paralel ölçümün sonucu alınarak bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. EP 9.0'da allantoinin kurutma kaybı sonucunun %0,1'den az olması gerektiği bildirilmiştir. Deney sonucunda maddenin kurutma kaybı %0,016 olarak bulunmuştur, bu değer literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur (EP 9.0 Allantoin Monograph).

3.1.4. Allantoinin FT-IR spektrumunun incelenmesi

Bölüm 2.2.1.4'de anlatıldığı şekilde elde edilen allantoinin FT-IR spektrumunda, maddenin fonksiyonel gruplarına ait bantlar Şekil 13'te gösterilmiştir. Yapıdaki C=O fragmentleri 1703, 1777 cm⁻¹ dalga boyunda, NH₂ fragmenti 1601 cm⁻¹ dalga boyunda etkileşim göstermiştir. 3053, 3338, 3434 cm⁻¹ bandında gözlemlenen pikler ise C-H ve N-H etkileşimlerine ait

sinyallerdir. Elde edilen bu veri, literatürde allantoin için verilen karakteristik FT-IR bantları ile uyumlu bulunmuştur (Alam ve Ahmad, 2015).



Şekil 13. Allantoinin FT-IR spektrumu

3.1.5. Lidokain HCl'nin çözünürlüğünün incelenmesi

Lidokain HCl'nin çözünürlük çalışmaları Bölüm 2.2.1.5'de anlatıldığı şekilde saptanmıştır ve pH 7,4 PBS tamponu içindeki çözünürlük değeri 104,092 mg/ml olarak bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 7'te gösterilmiştir.

Tablo 7. Lidokain HCl çözünürlük değerleri

Lidokain HCl'nin Çözünürlük Değeri (mg/ml)	SS	RSS	N*
104,092	1,096	1,053	3

*: Paralel sayısı

3.1.6. Lidokain HCl'nin erime noktasının tayini

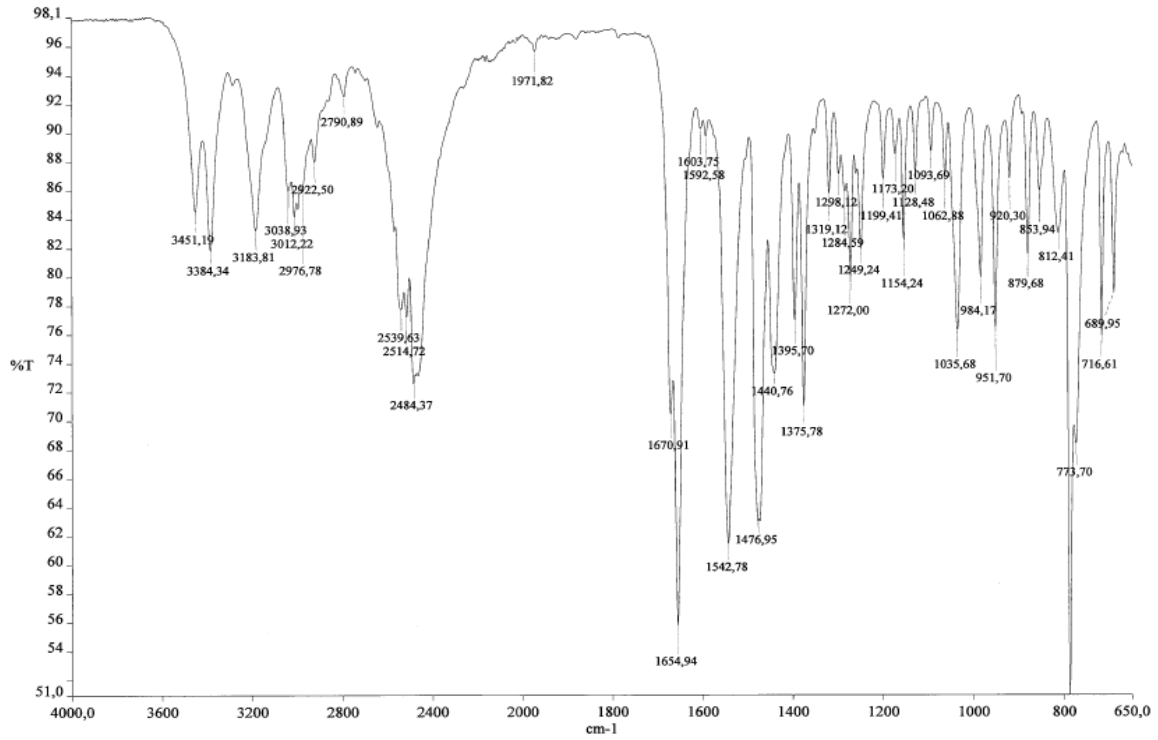
Lidokain HCl'nin erime noktası tayini 3 paralel ölçümün sonucu alınarak bölüm 2.2.1.6'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. EP 9.0'da lidokain HCl'nin 74 °C – 79 °C arası eridiği belirtilmiştir. Deney sonucunda maddenin 77 °C'de eridiği görülmüştür, bu değer literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur (EP 9.0 Lidocaine Hydrochloride Monograph).

3.1.7. Lidokain HCl'nin su içeriğinin tayini

Lidokain HCl'nin su içeriği tayini 3 paralel ölçümün sonucu alınarak bölüm 2.2.1.7'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. EP 9.0'da Lidokain HCl'nin su içeriği sonucunun %5.5-%7.0 arası olması gerektiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda maddenin su içeriği %6.3 olarak bulunmuştur, bu değer literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur (EP 9.0 Lidocaine Hydrochloride Monograph).

3.1.8. Lidokain HCl'nin FT-IR spektrumunun incelenmesi

Bölüm 2.2.1.8'de anlatıldığı şekilde elde edilen Lidokain HCl'nin FT-IR spektrumunda, maddenin fonksiyonel gruplarına ait bantlar Şekil 14'te gösterilmiştir. Yapıdaki C=O fragmenti 1654 cm⁻¹ dalga boyunda etkileşim göstermiştir. 3012 ve 3384 cm⁻¹ bandında gözlemlenen pikler ise C-H ve N-H etkileşimlerine ait sinyallerdir. Elde edilen bu veri, literatürde Lidokain için verilen karakteristik FT-IR bantları ile uyumlu bulunmuştur (Badawi ve ark., 2016).

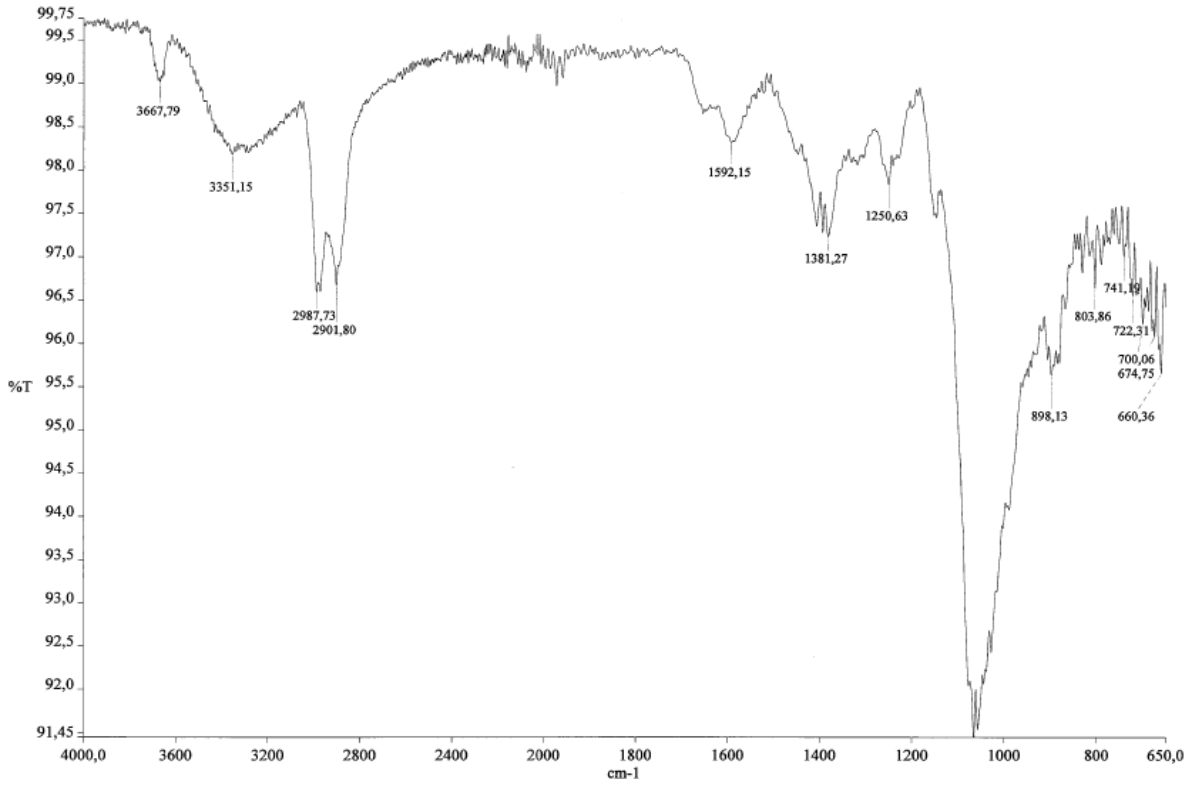


Şekil 14. Lidokain HCl FT-IR spektrumu

3.2. Polimerlerin Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1. Kitozanın FT-IR spektrumunun incelenmesi

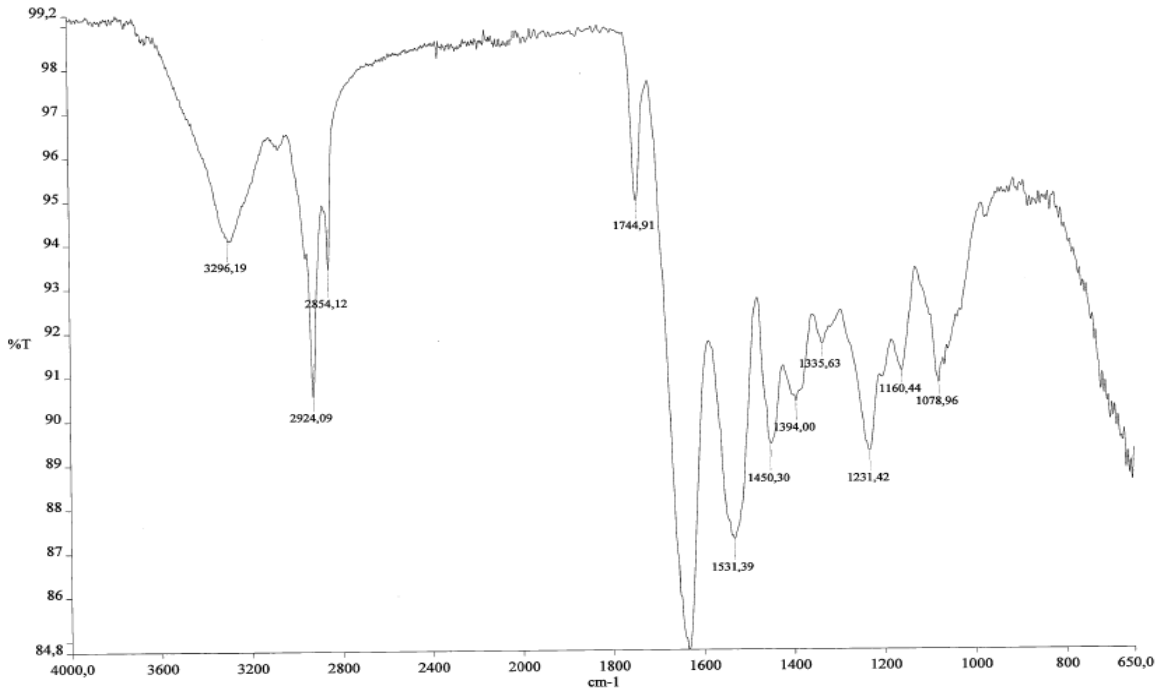
Bölüm 2.2.2.1’de anlatıldığı şekilde elde edilen kitozanın FT-IR spektrumunda, maddenin fonksiyonel gruplarına ait bantlar Şekil 15’te gösterilmiştir. Yapıdaki N-H fragmenti 3351 cm^{-1} dalga boyunda etkileşim göstermiştir. 2901 ve 2987 cm^{-1} bandında gözlemlenen pikler ise C-H etkileşimlerine ait sinyallerdir. 1592 cm^{-1} bandındaki pikin C=O ve 1381 cm^{-1} bandındaki pikin de C-N bağlarını ifade eden sinyaller olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bu veriler, literatürde kitozan için verilen karakteristik FT-IR bantları ile uyumlu bulunmuştur (Queiroz ve ark., 2015).



Şekil 15. Kitozanın FT-IR spektrumu

3.2.2. Kollajenin FT-IR spektrumunun incelenmesi

Bölüm 2.2.2.2’de anlatıldığı şekilde elde edilen FT-IR spektrumunda, kollajenin fonksiyonel gruplarına ait bantlar Şekil 16’da gösterilmiştir. 1231 ve 1335 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler kollajen molekülünün protein bütünlüğünü doğrulayan sinyallerdir. 3296 cm^{-1} bandında gözlemlenen pik ise N-H etkileşimini ifade etmektedir (Sripriya ve Kumar, 2015). 1600-1700 cm^{-1} bandında bulunan pikin amid grubuna ait karakteristik kollajen piki olduğu söylenebilmektedir (Fernandes ve ark., 2011). 2924 ve 2854 cm^{-1} bantlarındaki piklerin CH_2 gerilimine bağlı olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bu veriler, literatürde kollajen için verilen karakteristik FT-IR bantları ile uyumlu bulunmuştur (Yan ve ark., 2008).

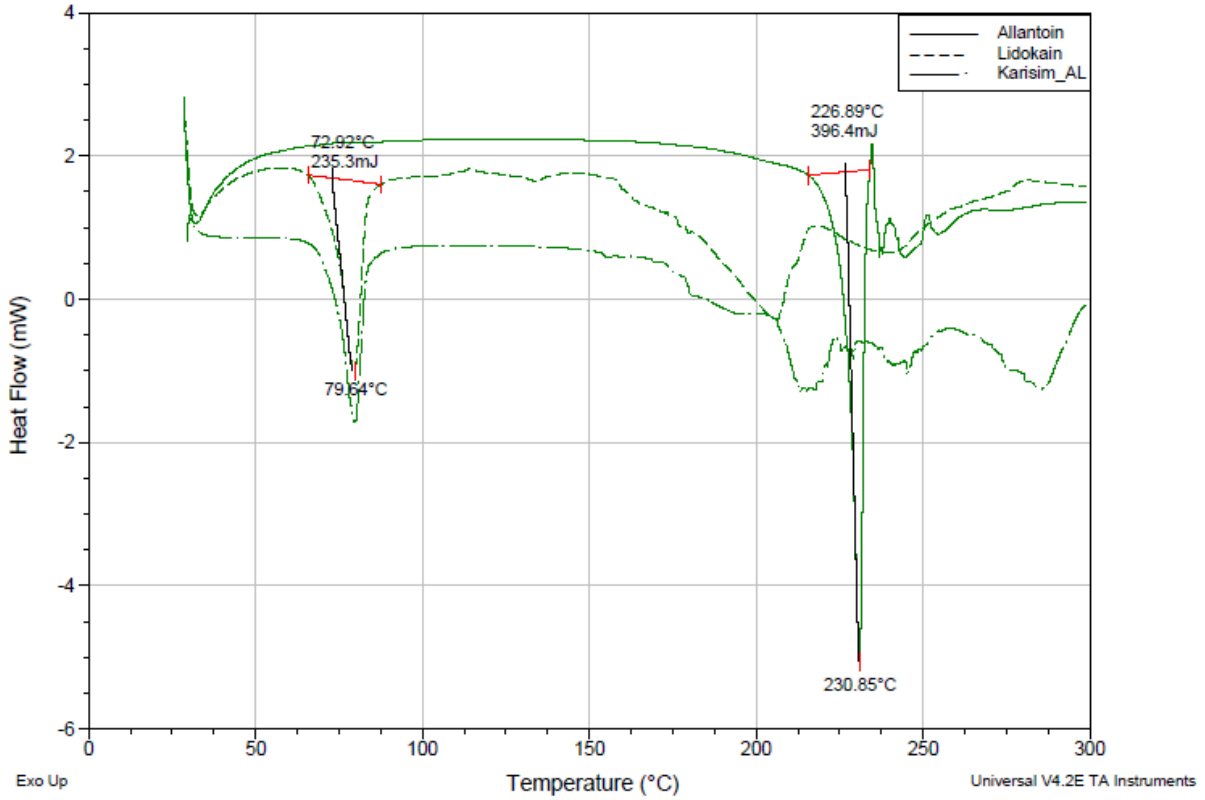


Şekil 16. Kollajenin FT-IR spektrumu

3.3. Formülasyon Bileşenleri Arası Geçimlilik Çalışması Bulguları

3.3.1. Etken maddeler arası geçimliliğin DSC ile değerlendirilmesi

Bölüm 2.2.3.1’de anlatıldığı şekilde elde edilen allantoin, lidokain HCl ve kütlece eşit miktarda allantoin-lidokain HCl içeren toz karışımının karşılaştırılmalı DSC termogramları Şekil 17’de gösterilmiştir.

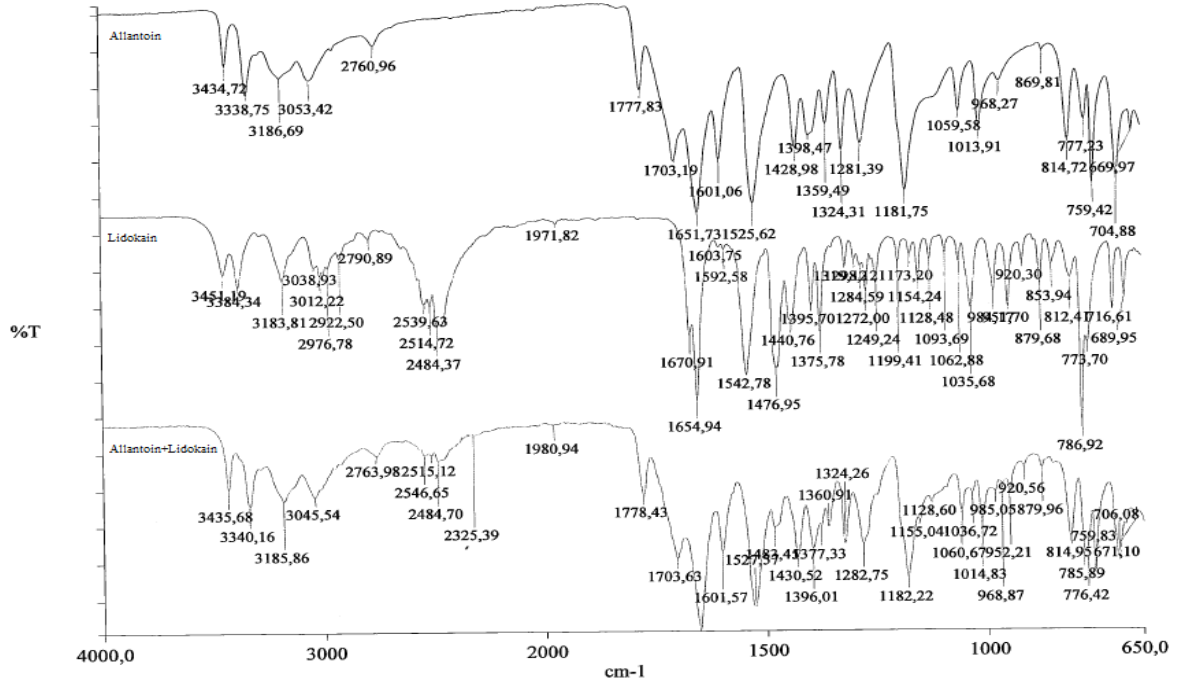


Şekil 17. Allantoin, Lidokain HCl, Allantoin-Lidokain HCl (1:1) karşılaştırmalı DSC termogramı

Elde edilen bulgularda lidokain HCl'nin erime noktası derecesinde verdiği pik karışım termogramında da görülürken, allantoinin erime derecesinde meydana gelen pik karışım termogramında belirgin bir şekilde görülememektedir. Bu durum iki etken madde arasında geçimsizlik olma ihtimaline yönelik daha fazla çalışma yapılması gerekliliğini doğurmaktadır.

3.3.2. Etken maddeler arası geçimliliğin FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi

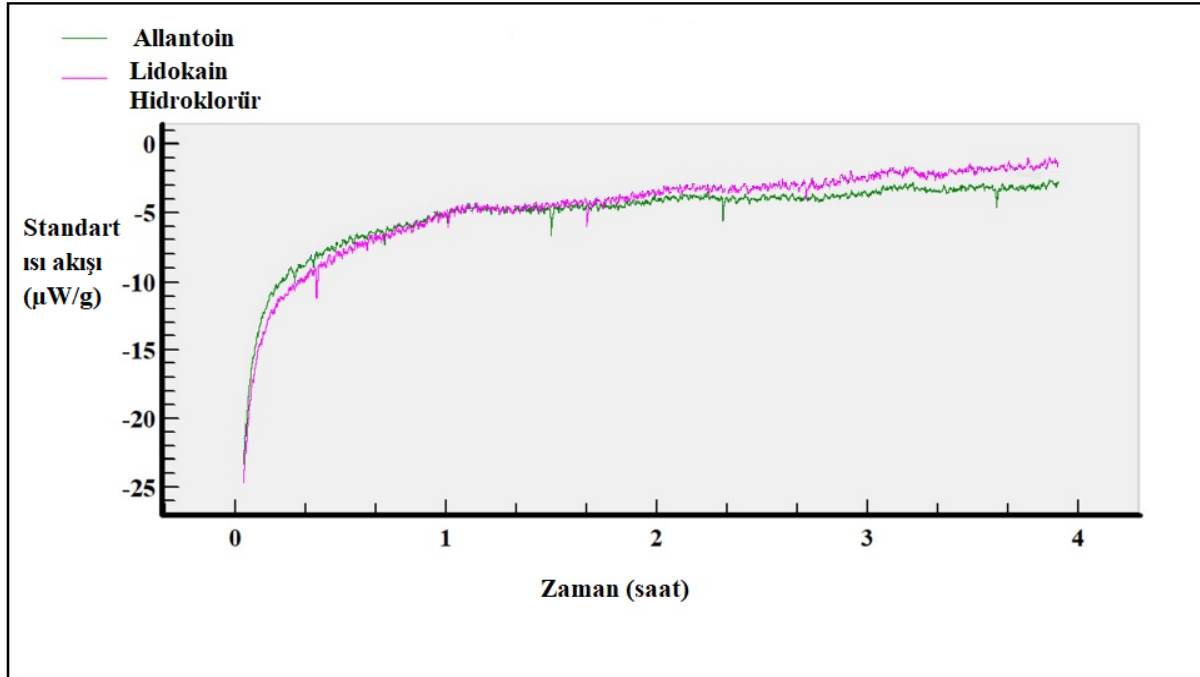
Bölüm 2.2.3.2'de anlatıldığı şekilde elde edilen Allantoin, Lidokain HCl ve kütlece eşit miktarda Allantoin-Lidokain HCl içeren toz karışımının karşılaştırmalı FT-IR spektrumları Şekil 18'de gösterilmiştir. Allantoin-lidokain HCl karışımına karşı allantoin korelasyon faktörü 0.929 iken, allantoin-lidokain HCl karışımına karşı Lidokain korelasyon faktörü 0.379 bulunmuştur. Karışım spektrumu incelendiğinde allantoine ait karakteristik piklerin lidokain HCl'e ait karakteristik piklere kıyasla daha yoğun görüldüğü söylenebilmektedir. Karışım spektrumunda iki etken maddenin ayrı ayrı spektrumlarında gözlenmeyen safsızlık olarak yorumlanabilecek karakteristik bir pik bulunmamaktadır.



Şekil 18. Allantoin, Lidokain HCl, Allantoin-Lidokain HCl (1:1) karşılaştırmalı FT-IR spektrumu

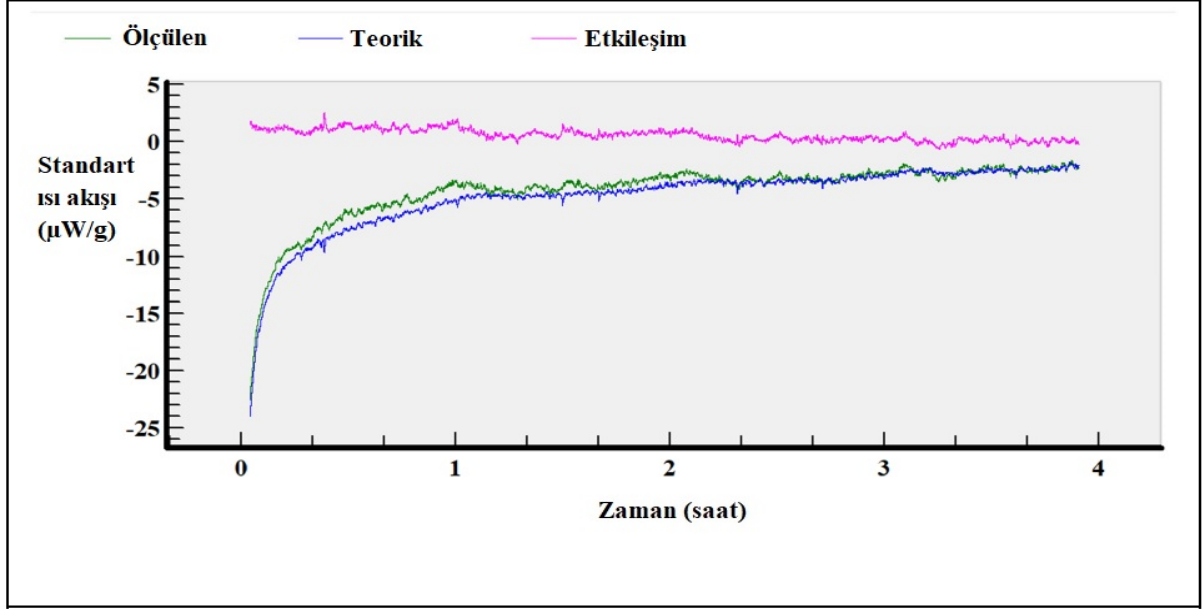
3.3.3. Etken maddeler arası geçimliliğin TAM-IV mikrokaleorimetre ile değerlendirilmesi

Bölüm 2.2.3.3'te anlatıldığı şekilde öncelikle etken maddelerin tek tek ölçümü alınmıştır. Etken maddeler Şekil 19'da görüldüğü gibi benzer bir ısı akışı grafiği göstermişlerdir.



Şekil 19. Allantoin ve lidokain HCl TAM-IV grafikleri

Daha sonra kütlege eşit miktarda allantoin ve lidokain HCl etken maddelerinde oluşan karışım tozu okutulmuştur. Şekil 20'de bileşenlerin tek tek okutulması sonucu oluşturulmuş teorik (elde edilmesi beklenen) grafik, karışımın ölçülmesi ile elde edilen grafik ve bu iki grafik arasındaki farklılıkları ifade ederek geçimsizliğin değerlendirilebildiği grafik birlikte sunulmuştur.

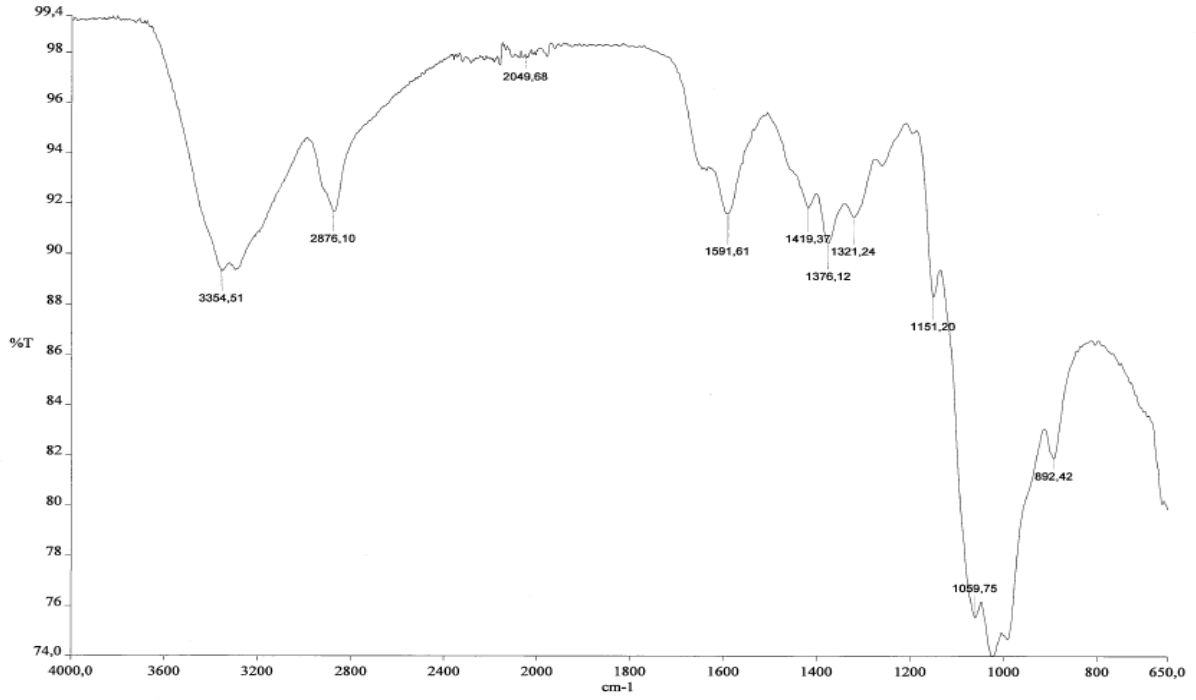


Şekil 20. Allantoin-lidokain HCl karışımını TAM-IV grafiği (549 nW/g ısı akışı)

Grafiğe göre elde edilmesi beklenen ve ölçülen ısı akış davranışları arasında neredeyse hiç fark bulunmamaktadır. Bu durum etken maddeler arasında geçimsizlik ihtimalini ortadan kaldırmaktadır (Cavatur ve ark., 2004; Liland ve Hvidsten, 2016).

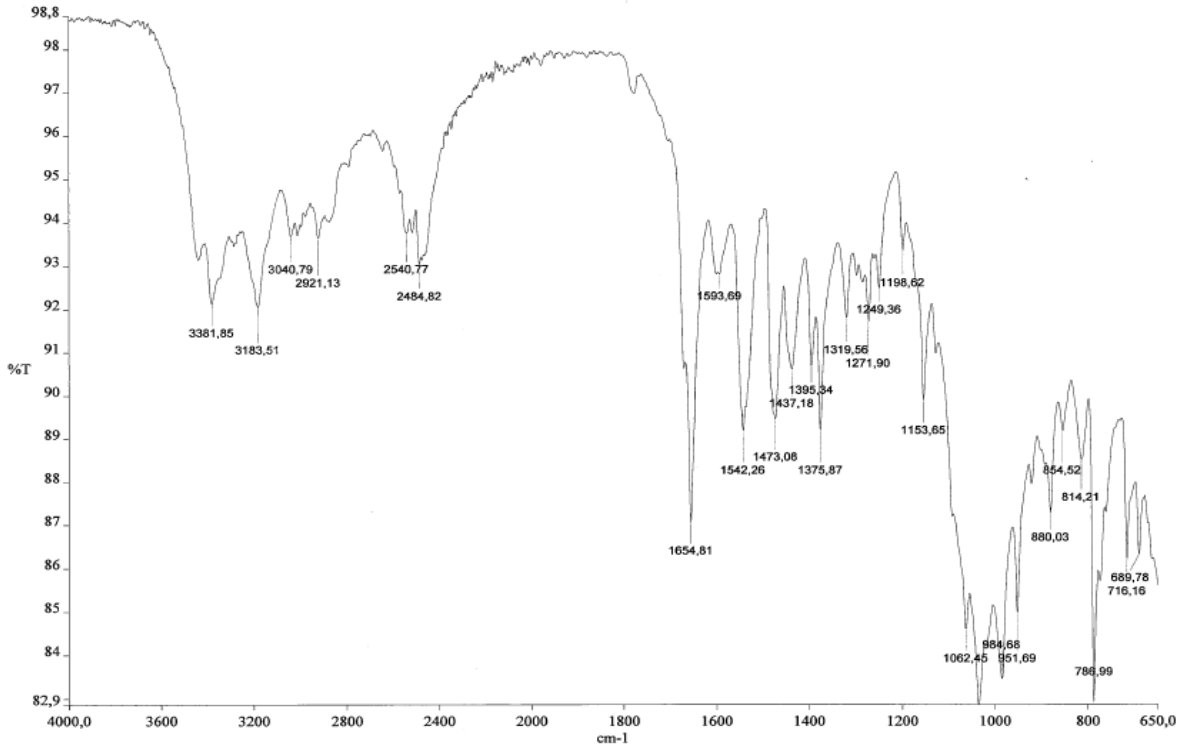
3.3.4. Polimerler ve etken maddeler arası geçimliliğin FT-IR ile değerlendirilmesi

Bölüm 2.2.3.4'de anlatıldığı şekilde elde edilen Kitozan-Kollajen ve Kitozan-Kollajen-Allantoin-lidokain HCl hammaddelerinden oluşan toz karışımları FT-IR spektrumları Şekil 21 ve Şekil 22'de gösterilmiştir.



Şekil 21. Kollajen-Kitozan (1:1) FT-IR spektrumu

Elde edilen spektrum incelendiğinde kitozan ve kollajen polimerlerinin tek tek ölçülmesi ile elde edilen karakteristik piklerden farklı bir pik gözlenmemektedir. Kollajen ve kitozan parçacıklarının fiziksel yapılarının farklılığından homojen bir karışım oluşturulamamıştır.



Şekil 22. Kollajen-kitozan-allantoin-lidokain HCl toz karışımı FT-IR spektrumu

Elde edilen spektrum incelendiğinde; kollajen, kitozan, allantoin ve lidokain HCl maddelerinin tek tek ölçülmesi ile elde edilen karakteristik piklerden farklı bir pik gözlenmemektedir. Kollajen ve kitozan parçacıklarının fiziksel yapılarının farklılığından homojen bir karışım oluşturulamamıştır.

3.4. Formülasyon Hazırlanmasına Ait Bulgular

3.4.1. Ön formülasyon hazırlanmasına ait bulgular

Ön formülasyon çalışmalarına Bölüm 2.2.4.1'de anlatıldığı şekilde başlanmış olup her aşama ilgili sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

F1 kodlu formülasyonun hazırlanması: Formülasyon geliştirmede ilk aşama olarak 0,5 M asetik asit çözeltisi içinde 1 mg/mL konsantrasyonunda iki ayrı kitozan ve kollajen çözeltisi hazırlanmış olup, çözünme özellikleri incelenmiştir. 25 °C'de 72 saat karıştırılan kollajen çözeltisinin yeterince homojen hale gelmediği tespit edilmiştir. Kollajen çözeltisi pH 7.4'e nötralize edildikten sonra, oda sıcaklığında 24 saat karıştırılan ve pH 7.4'e nötralize edilen kitozan çözeltisi ile karıştırılmıştır. İki polimer çözeltisinin karıştırılması, Tablo 3'te belirtilen oranlarda kollajen ve kitozan oranları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan karışımlar, kalıplara dökülmüş ve oda sıcaklığında 72 saat boyunca kurutulmuştur. 72. saat sonunda polimer çözeltilerinin yeterince kurumadığı gözlenmiştir. Kollajen çözeltisi için 72 saat karıştırma süresinin stabilite açısından sorun teşkil edebileceği düşünülerek daha fazla literatür araştırılması yapılması gerektiğine karar verilmiştir.

F2 kodlu formülasyonun hazırlanması: Kollajenin homojen olarak çözünmesini sağlamak amacıyla, aynı konsantrasyonda hazırlanan kollajen çözeltisi literatürden yola çıkarak 4 °C'de karıştırılmıştır (Caliari ve ark., 2011). Bu sayede kollajenin uzun karıştırma süresi sonunda stabilitesini koruması ve kollajenin jelleşmesinin önlenmesi amaçlanmıştır (Doyle, 2017). Bu değişiklik ile kollajenin çözünme süresi 48 saate düşürülmüştür. Kalıplara dökülen polimer çözeltileri, oda sıcaklığında 72 saat boyunca kurutulmuştur.

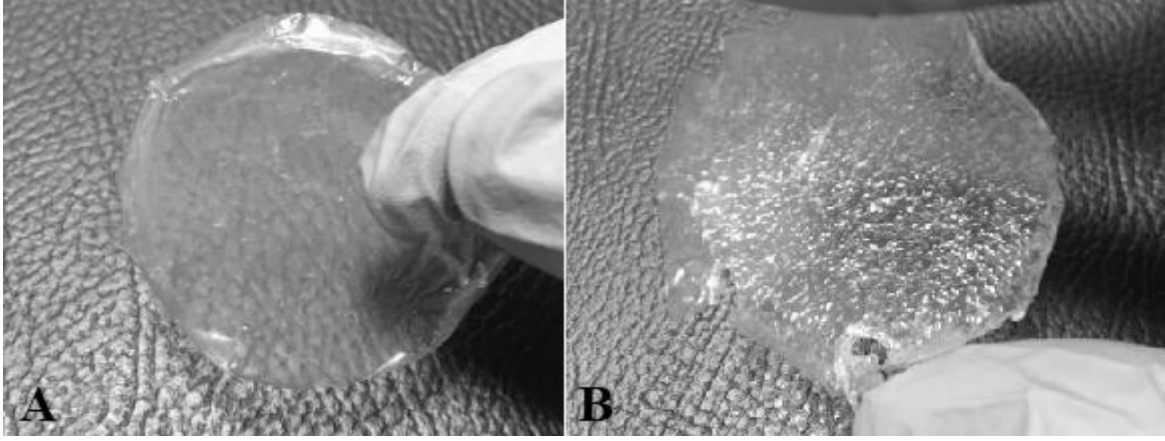
F3 kodlu formülasyonun hazırlanması: Aynı konsantrasyonlarda aynı yöntemle hazırlanan çözeltiler kalıplara döküldükten sonra 60 °C etüv ortamında kurutulmuştur. Bu işlem ile 72 saat sonunda kuruma gerçekleşmiş ancak skafoldun uygun fiziksel görünümde olmadığı tespit edilmiştir. 60 °C etüv ortamında kurutma işleminin skafoldun stabilitesini ve fiziksel yapısını olumsuz etkileyebileceği düşünülmüştür.

F4 kodlu formülasyonun hazırlanması: Yukarıda bahsedilen duruma istinaden yeni formülasyonlar aynı metot ile hazırlanmış ve 30 °C etüv ortamında kurutulmuştur. Bu şekilde hazırlanan skafoldların daha iyi durumda olduğu ancak polimer çözeltisinin uygun yoğunlukta olmaması nedeniyle filmlerin kalınlıklarının uygun olmadıkları tespit edilmiştir.

F5 kodlu formülasyonun hazırlanması: Kitozan çözeltisi konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde artırılmıştır. Skafoldların bu haldeki fiziksel görünümü iyileşmiştir fakat yeterli bulunmamıştır. 12 saat 30 °C etüvde kurutma uygun bulunmuştur. Hazırlanan konsantrasyondaki kitozan çözeltisinin pH 7,4'e nötralizasyonu yapıldığında homojen görünmediği tespit edilmiştir.

F6 kodlu formülasyonun hazırlanması: Kollajen çözeltisi konsantrasyonu da kitozan çözeltisi konsantrasyonu gibi 10 mg/mL'ye çıkarılmıştır. Kitozan çözeltisinin homojen görünmeme probleminin aşılabilmesi amacıyla pH 4,0'e ayarlama yapılmıştır ve bu nedenle de karıştırma süresi 24 saatten 2 saate inmiştir. Ancak bu pH ayarlaması ile %100 kitozandan oluşturulmuş skafoldlar kurduktan sonra 37 °C PBS tamponu içine atıldıklarında erimişlerdir. Literatürde de benzer bir çalışma yapılmıştır (Tanabe ve ark., 2002).

F7 kodlu formülasyonun hazırlanması: Kitozan çözeltisinin optimum nötralizasyon pH'sı da 6,0 olarak tespit edilmiştir. Hem kollajen, hem de kitozan çözündükten sonra jelleşmektedir. Bu iki polimerin manyetik karıştırıcı ile homojen bir şekilde karışmayabileceği düşünülmüştür. Hazırlanan skafoldlardaki polimerlerin homojen şekilde karışmasını sağlamak için homojenizatör kullanımına karar verilmiştir. Homojenizatör kullanımı sonrası çözeltinin tekrar manyetik karıştırıcı ile 4 °C'de karıştırılmaya devam edilerek köpüğünün azaltılması gerektiği saptanmıştır. Aksi takdirde Resim 1'de görüldüğü gibi skafold içerisinde hava kabarcıkları gözlenmiştir. Ayrıca homojenizatör kullanımı ile kollajen çözeltisinin karıştırma süresi 24 saate düşürülmüştür.

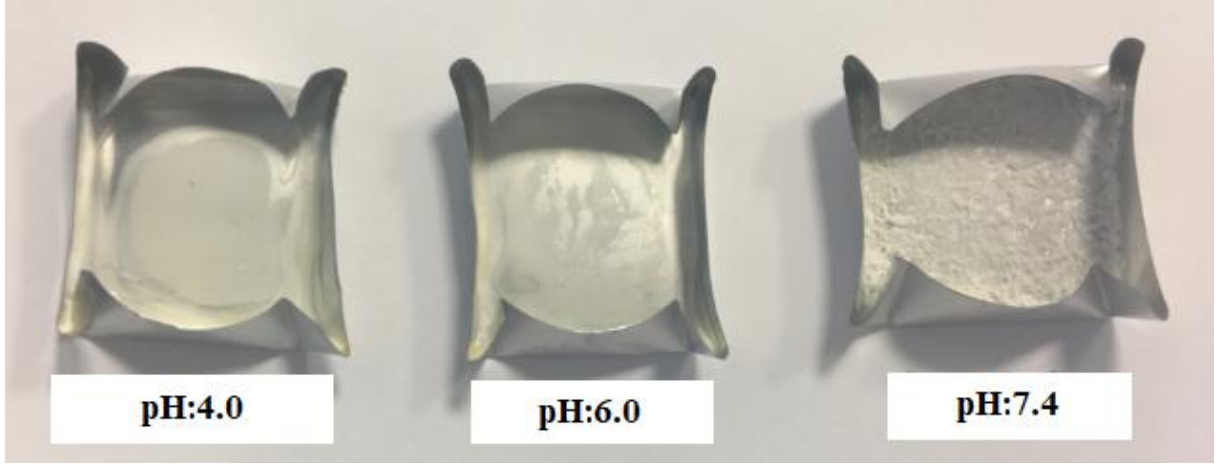


Resim 1. Kollajen çözeltisi için homojenizatör kullanımı. Homojenizatör kullanımı sonrası 4 °C'de karıştırılmış çözelti ile elde edilen film (A) ve köpük içeren çözelti ile elde edilen film (B).

F8 kodlu formülasyonun hazırlanması: Kollajen çözeltisinin de nötralizasyonunun pH:6,0 olarak yapılması skafold üretiminde kolaylık sağlayacağından denenmiş ve uygun bulunmuştur.

F9 kodlu formülasyonun hazırlanması: Her iki çözelti için nötralizasyon yapılmayan durum değerlendirilmiş olup, bu şekilde hazırlanan kollajen çözeltisinden oluşan skafoldlarda fiziksel bir farklılık gözlenmezken, kitozan skafoldların şeffaf ve suya karşı diğer formülasyon serilerine kıyasla daha dayanıksız olduğu gözlenmiştir. Literatür incelendiğinde de nötralizasyon aşamasının filmin fizikokimyasal özellikleri (Noriega ve Subramanian, 2011; Humberto ve ark., 2015), biyoyumluluğu (He ve ark., 2011), antibakteriyel yapısı (Fernández-de Castro ve ark., 2016) ve ilaç salım özellikleri (Becerra ve ark., 2017) gibi konulara etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Mauricio-Sánchez ve ark., 2018). Nötralizasyon yapılmamış kitozan çözeltisinin pH değeri 3,4 iken, kollajen çözeltisi için bu değer 2,7 olarak ölçülmüştür.

Kitozan çözeltisinin NaOH ile nötralizasyonu pH 4,0, 6,0 ve 7,4 olarak aynı zamanda ayrı skafoldlar ile yapılmış, sonrasında kıyaslanarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Resim 2'de görüldüğü gibi nötralizasyonu yapılan tüm skafoldlar beyazımsı-yarı saydam halde olup, pH 7,4 olan skafold diğer iki skafold kadar homojen değildir.



Resim 2. Kitozanın pH 4,0, 6,0 ve 7,4’de nötralizasyonu ile hazırlanan skafoldların görünümü

Önformülasyon çalışmaları sonrasında F8 numaralı formülasyondan hareketle F10 formülasyonu hazırlanmıştır (Tablo 4). Bu formülasyonda iki polimer de 24 saat 4 °C koşulunda birlikte çözelti haline getirilmiş olup karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu hazırlama yöntemi ile ön formülasyon çalışmasındaki diğer formülasyonlara kıyasla, daha homojen bir formülasyon hazırlanması amaçlanmıştır. Ayrıca bu yöntem, pipetleme hatalarının önlenmesini sağlamıştır, ayrı ayrı jel olarak hazırlanan polimerlerin karıştırılma esnasındaki hataların giderilmesi mümkün olmuştur ve aynı zamanda formülasyon hazırlama kolaylığı da sağlanmıştır. 4 °C koşulu kitozanın çözünmesi ve jelleşmesi ile ilgili olumsuz bir sonuç ortaya çıkmasına neden olmamıştır.

3.4.2. Formülasyon hazırlanmasına ait bulgular

Kollajenin pahalı bir materyal olması, çözünmesinin uzun sürmesi, polimerin peptid bağlarının kırılması ve denatüre olabilmesi gibi stabilite problemleri sebepleri ile polimer olarak %100 kollajen içeren skafold formülasyonu elenmiştir ve bu formülasyona etken madde yüklenmemiştir (Kishen ve ark., 2016). Kitozan kollajene bağlanmayı sağlayan ek amino grupları içerdiği için kollajen kitozan ile birlikte formüle edildiğinde, kollajenaz degradasyonuna karşı daha dayanıklı bir yapı elde edilebilmektedir (Ti ve ark., 2014) (Bölüm 2.2.4.2).

3.4.2.1. Formülasyona etken maddelerin yüklenmesi

Allantoin ve lidokain HCl etken maddeleri Bölüm 2.2.4.2.1’de anlatıldığı şekilde skafoldlara yüklenmiş olup, işlem etkinliği Bölüm 3.5.2.2’de değerlendirilmiştir.

3.5. Formülasyonun Karakterizasyon Çalışmalarına ait Bulgular

3.5.1. Etken madde yüklenmemiş skafoldların karakterizasyonu

3.5.1.1. Skafoldların kalınlıklarının değerlendirilmesi

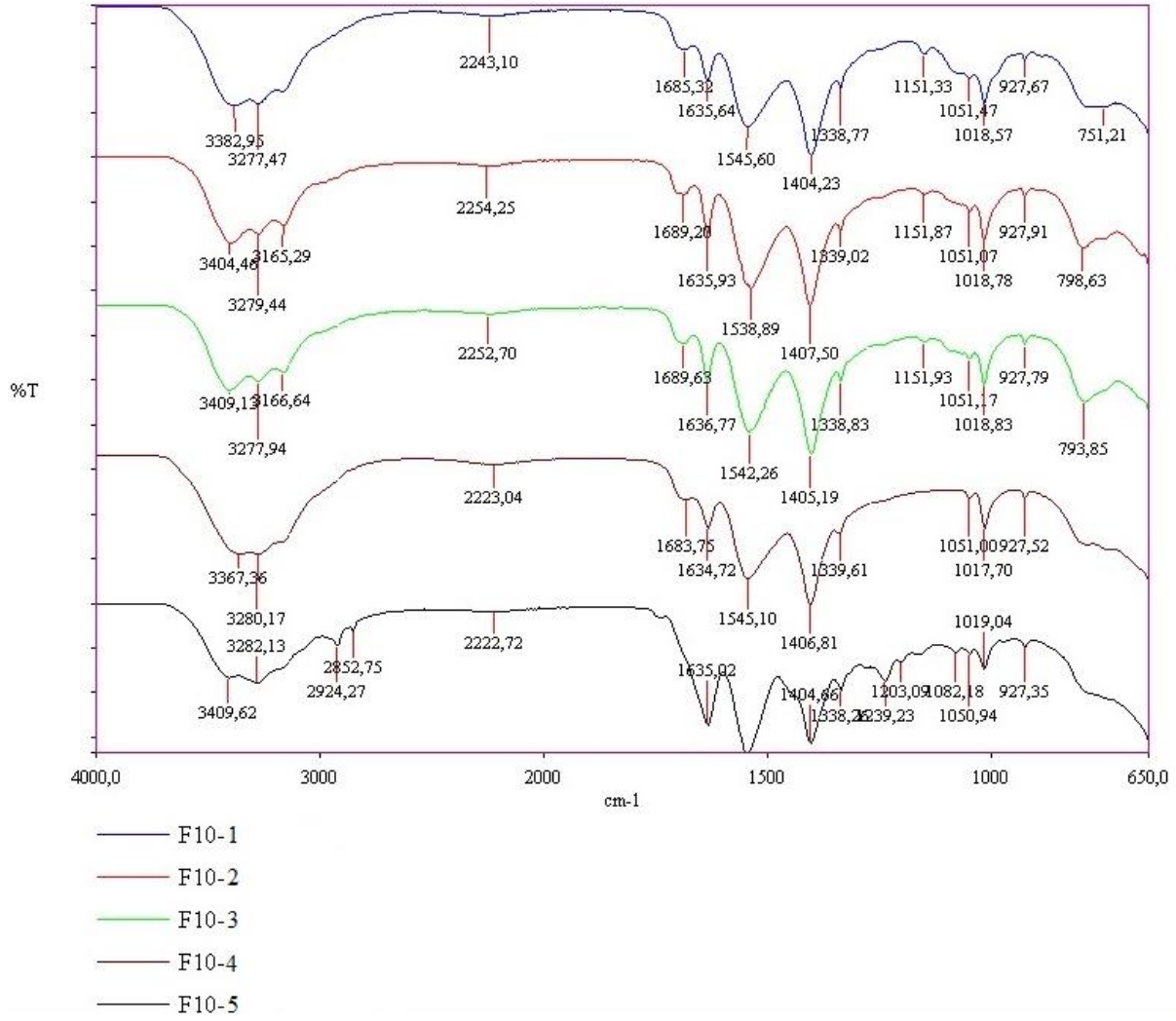
Hazırlanan skafoldların kalınlıkları Bölüm 2.2.5.1.4'te anlatıldığı şekilde hesaplanmış olup sonuçlar Tablo 8'de sunulmuştur. Hesaplamalar sonucu elde edilen veriler ve bu verilerin standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri bulunmuştur.

Tablo 8. Skafoldların kalınlık değerleri

	F10-1	F10-2	F10-3	F10-4	F10-5
	0,49	0,42	0,32	0,26	0,18
	0,41	0,39	0,25	0,18	0,16
	0,43	0,37	0,20	0,24	0,22
Ortalama	0,44	0,39	0,26	0,23	0,19
SS	0,04	0,03	0,06	0,04	0,03
RSS	9,39	6,40	23,48	18,37	16,37

3.5.1.2. Skafoldların FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi

Hazırlanan skafoldların FT-IR ile karakterizasyonu Bölüm 2.2.5.1.1'de anlatıldığı şekilde yapılmış olup sonuçlar Şekil 23'te sunulmuştur. Spektrumlar incelendiğinde kollajenin karakteristik piki olan $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda görülen amid pikinin (Bölüm 3.2.2) F10-5 formülasyonunda daha belirgin olduğu görülebilmektedir. Sonuçlar literatür sonuçları ile de uyumluluk göstermektedir (Fernandes ve ark., 2011; Ungureanu ve ark., 2015).

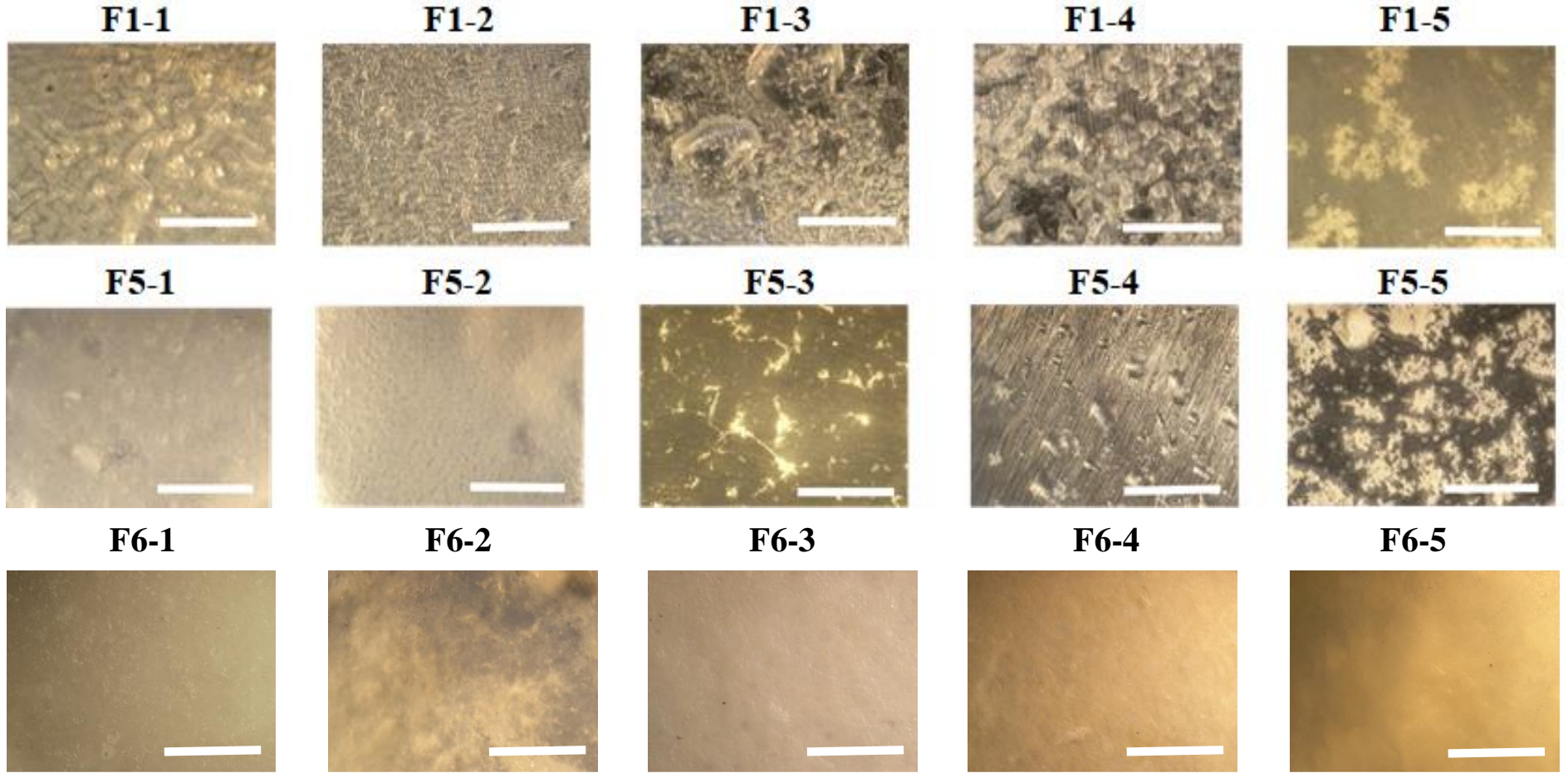


Şekil 23. Etken madde içermeyen skafold formülasyonlarının FT-IR spektrumları

3.5.1.3. Skafoldların fiziksel görünümünün optik mikroskop ile değerlendirilmesi

Numune yüzeylerinde makroskobik değerlendirilmesi için dijital kamera ile bağlanmış (Olympus C-5060) optik mikroskop (Olympus SZX7) kullanılmıştır.

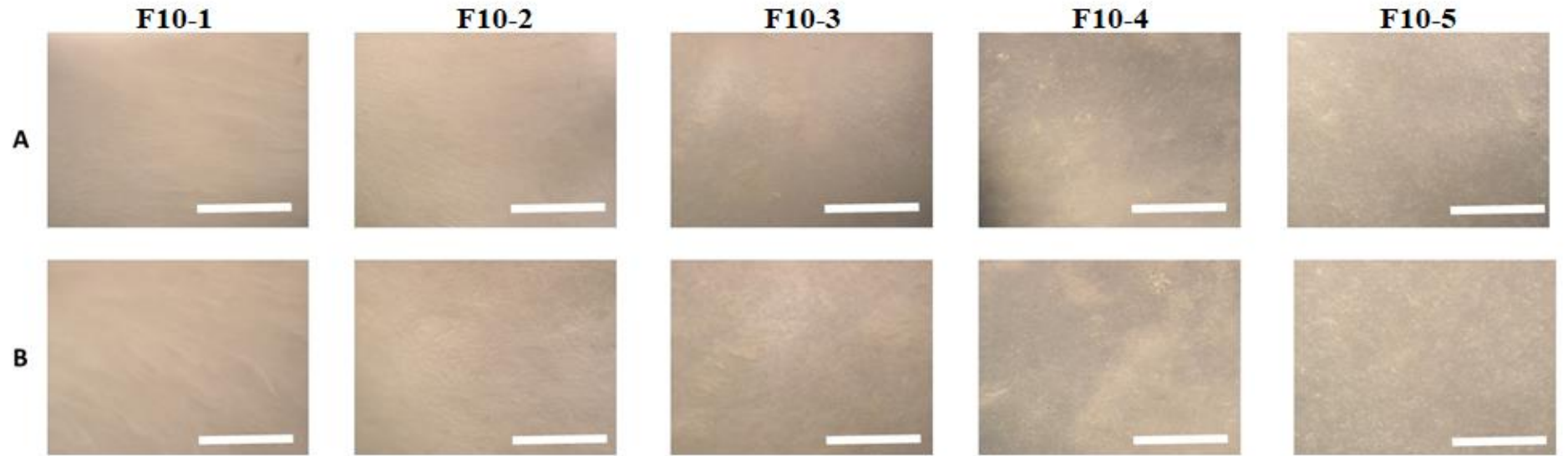
Elde edilen verilere göre, numune yüzeylerinde makroskobik çatlakların ve büyük boyutta düzensizliklerin olmadığı saptanmıştır (Şekil 26). Aşağıda uygun bulunan F10 formülasyonlarına ek olarak uygun bulunmayan F1, F5 ve F6 formülasyonlarına ait optik mikroskop verileri de sunulmuştur (Şekil 24-25).



Şekil 24. F1, F5 ve F6 numaralı formülasyonların optik mikroskop görüntüsü (Ölçek: 4 mm)



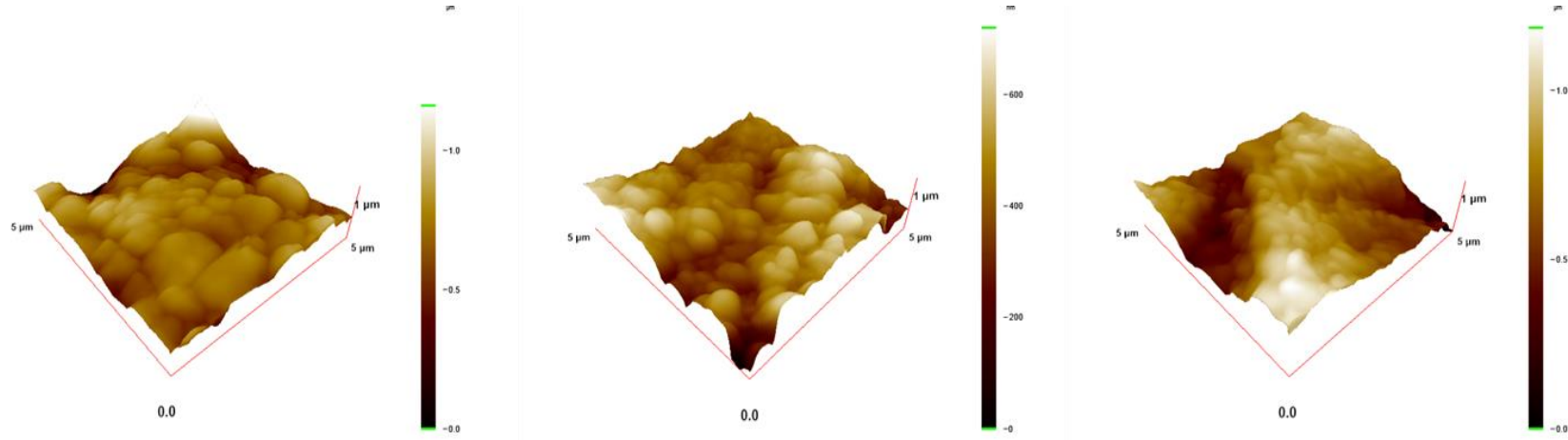
Şekil 25. F6-5 numaralı formülasyonun farklı bölgelerinden alınan optik mikroskop görüntüleri (Ölçek: 2 mm)



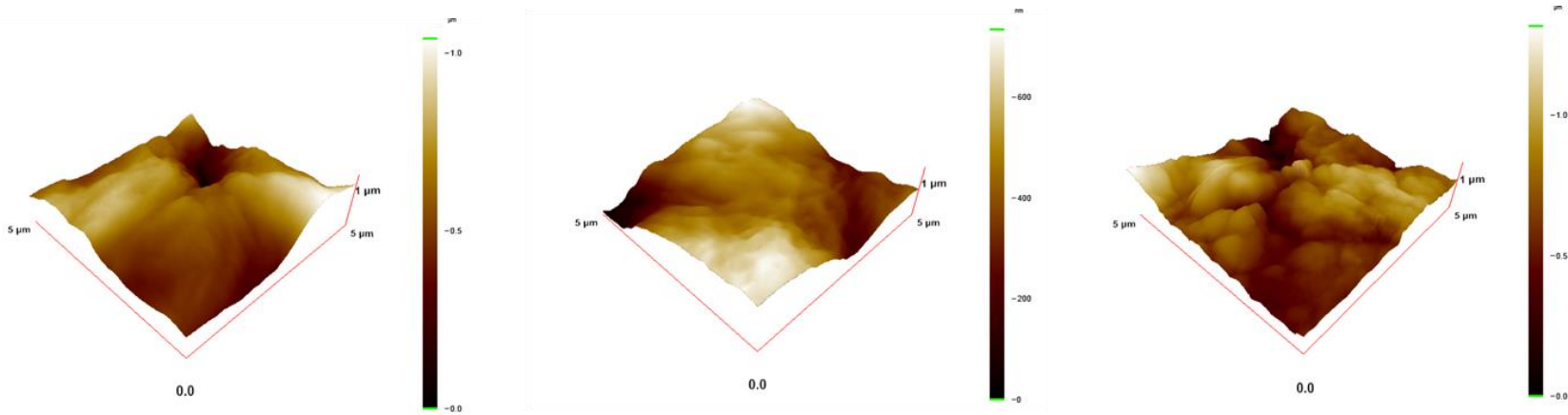
Şekil 26. F10-1, F10-2, F10-3, F10-4 ve F10-5 numaralı formülasyonların optik mikroskop görüntüsü (Ölçek: A serisi için 4 mm, B serisi için 2 mm)

3.5.1.4. Skafoldların AFM ile karakterizasyonu

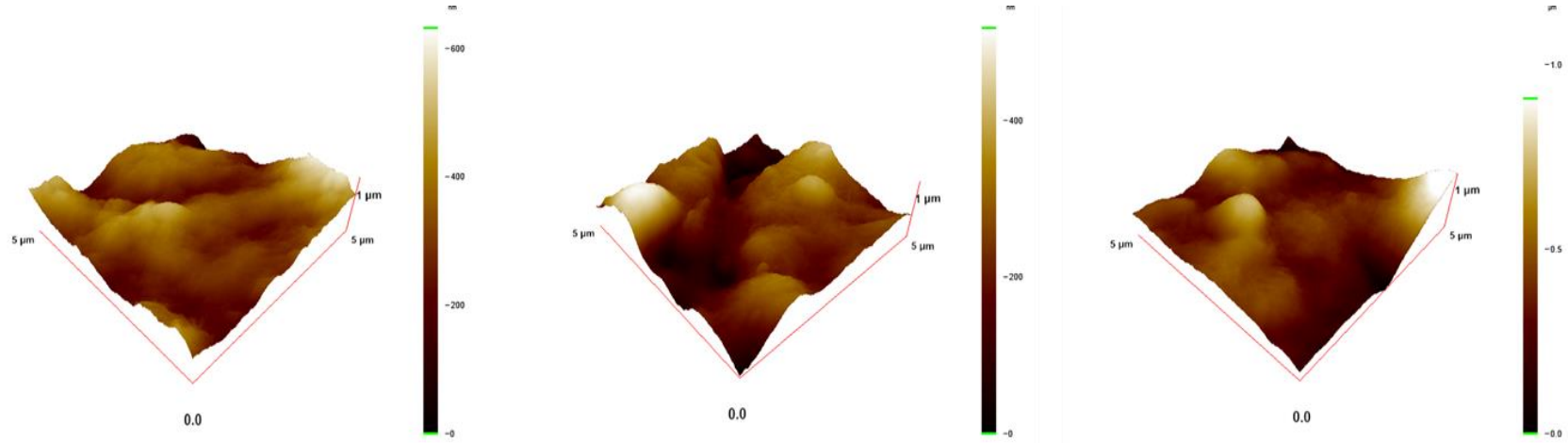
Hazırlanan skafoldların AFM ile karakterizasyonu Bölüm 2.2.5.1.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş olup Şekil 27-31'da gösterilmiştir.



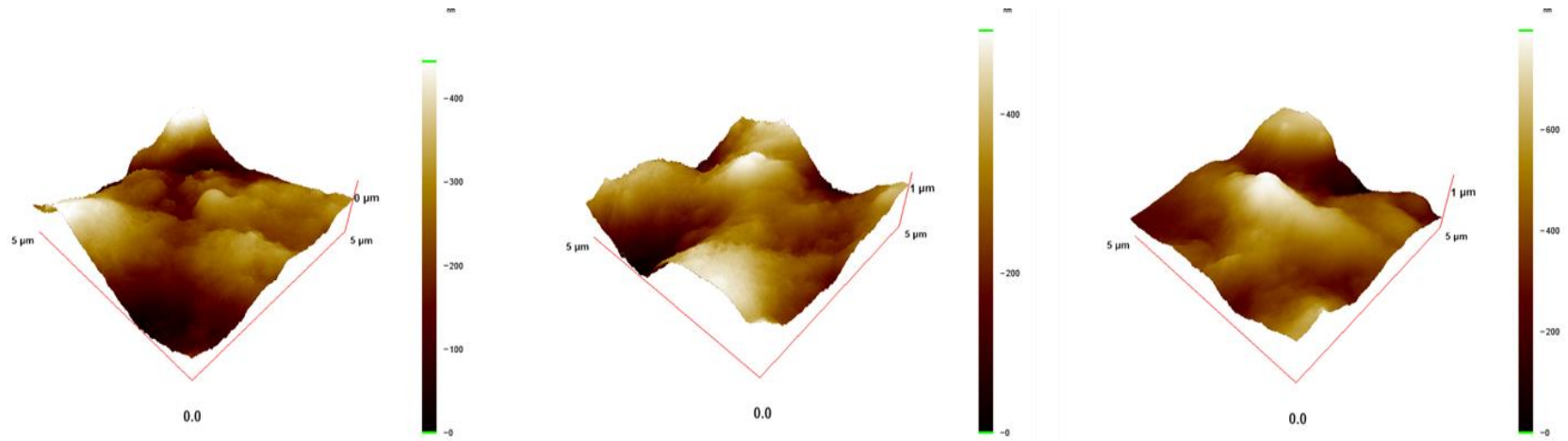
Şekil 27. F10-1 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 μm x 5 μm tarama)



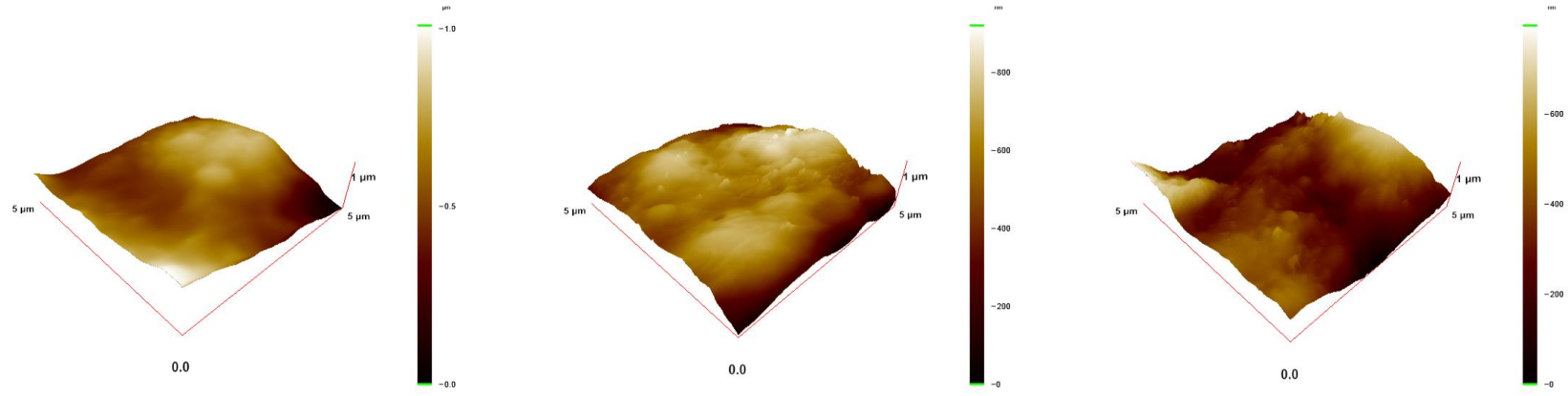
Şekil 28. F10-2 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 μm x 5 μm tarama)



Şekil 29. F10-3 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)



Şekil 30. F10-4 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)



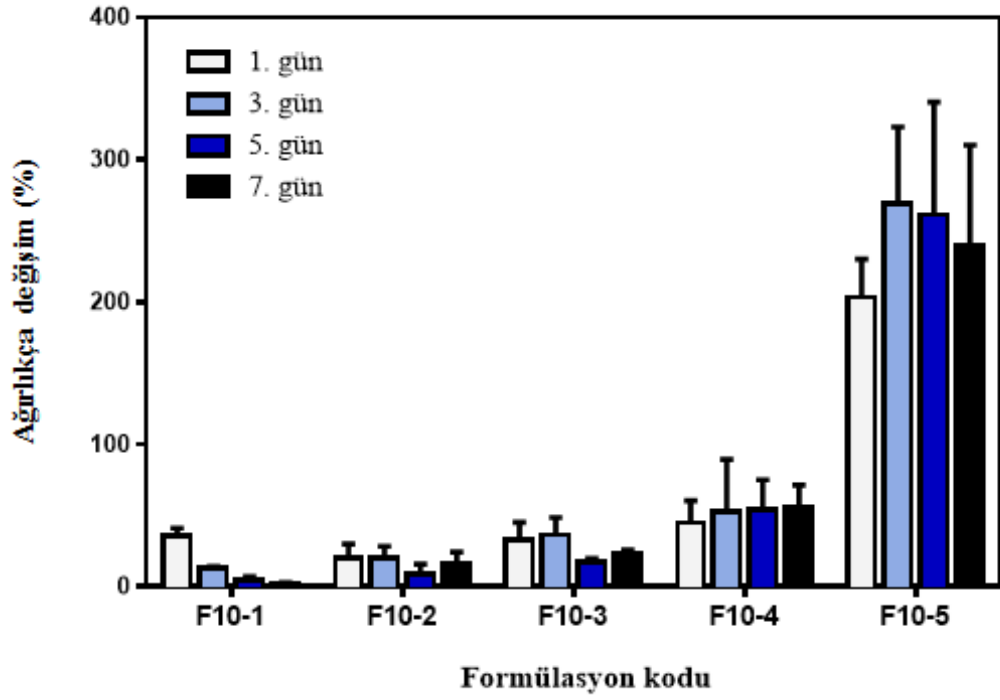
Şekil 31. F10-5 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 μm x 5 μm tarama)

3.5.1.5. Skafoğların Şişme zelliklerinin değerlendirilmesi

Hazırlanan skafoğların Şişme yüzde değişimleri Bölüm 2.2.5.1.5'te anlatıldığı Şekilde hesaplanmış olup Tablo 9 ve Şekil 32'de gösterilmiştir. Hesaplamalar sonucu elde edilen veriler ile bu verilerin standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri bulunmuştur.

Tablo 9. Skafoğ Şişme yüzde değişim değerleri

Skafoğ Şişme Yüzde Değişim Değerleri					
Zaman	F10-1	F10-2	F10-3	F10-4	F10-5
1. gün ortalama	35,518	20,579	32,766	44,924	203,628
SS	5,724	9,606	12,567	15,656	26,656
RSS	16,115	46,682	38,353	34,850	13,091
3. gün ortalama	13,184	20,323	36,485	52,627	269,001
SS	0,980	8,123	12,310	37,012	54,154
RSS	7,433	39,971	33,740	70,329	20,131
5. gün ortalama	5,044	9,058	17,128	54,719	261,514
SS	2,310	7,058	2,837	20,585	78,984
RSS	45,802	77,924	16,562	37,619	30,203
7. gün ortalama	2,171	15,871	23,634	55,588	240,263
SS	0,871	8,719	2,433	15,809	70,066
RSS	40,122	54,939	10,296	28,439	29,162



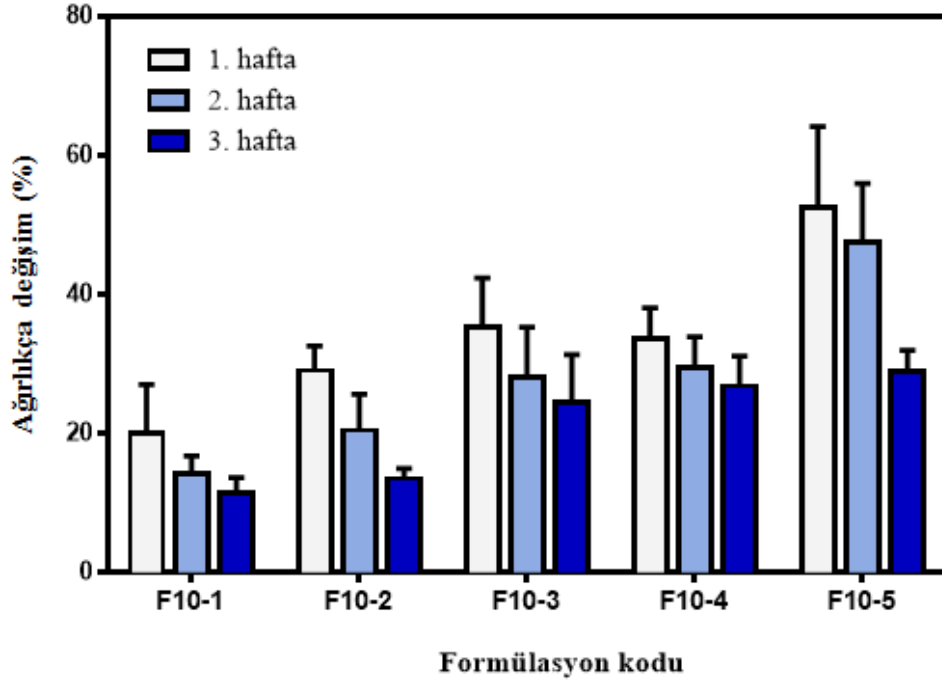
Şekil 32. Skafold şişmesine bağlı olarak ağırlıkça yüzde değişim grafiği. 1., 3., 5. ve 7. gün yapılan tartımlar sonrası skafodlarda meydana gelen ağırlık değişimi yüzde olarak verilmiştir.

3.5.1.5. Skafoldların hidrolitik degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesi

Hazırlanan skafoldların hidrolitik degradasyon yüzde değişimleri Bölüm 2.2.5.1.6'da anlatıldığı şekilde hesaplanmış olup Tablo 10 ve Şekil 33'te gösterilmiştir. Hesaplamalar sonucu elde edilen veriler ile bu verilerin standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri bulunmuştur.

Tablo 10. Skafold hidrolitik degradasyon değerleri

Skafold Hidrolitik Degradasyon Değerleri				
	Başlangıç (%)	1 Hafta Sonunda Kalan Miktar (%)	2 Hafta Sonunda Kalan Miktar (%)	3 Hafta Sonunda Kalan Miktar (%)
F10-1 Ortalama	100	20,088	14,242	11,377
SS	-	6,931	2,503	2,286
RSS	-	34,501	17,576	20,091
F10-2 Ortalama	100	29,040	20,443	13,488
SS	-	3,521	5,223	1,461
RSS	-	12,124	25,549	10,829
F10-3 Ortalama	100	35,384	28,093	24,433
SS	-	7,004	7,212	6,924
RSS	-	19,795	25,672	28,340
F10-4 Ortalama	100	33,535	29,517	26,832
SS	-	4,506	4,358	4,297
RSS	-	13,436	14,764	16,016
F10-5 Ortalama	100	52,572	47,565	28,989
SS	-	11,593	8,413	2,952
RSS	-	22,052	17,688	10,182



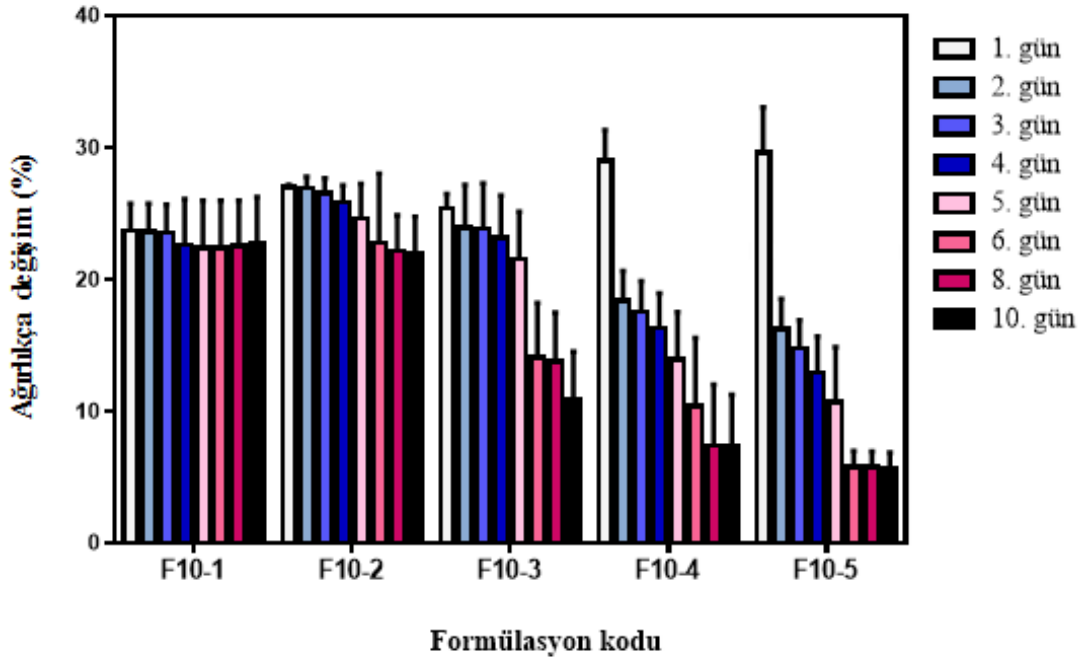
Şekil 33. Skafold hidrolitik degradasyon yüzde değişim grafiği. 1., 2. ve 3. hafta yapılan numuneler sonunda skafoldlarda meydana gelen ağırlık değişimi yüzde cinsinden ifade edilmiştir.

3.5.1.6. Skafoldların *in-vitro* kollajenaz degradasyon özelliklerinin değerlendirilmesi

Hazırlanan skafoldların hidrolitik degradasyon yüzde değişimleri Bölüm 2.2.5.1.7’de anlatıldığı şekilde hesaplanmış olup Tablo 11 ve Şekil 34’de gösterilmiştir. Hesaplamalar sonucu elde edilen veriler ile bu verilerin standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri bulunmuştur.

Tablo 11. Skafold *in-vitro* kollajenez degradasyon değerleri

Skafold <i>in-vitro</i> Kollajenez Degredasyon Değerleri									
	Başlangıç (%)	1 Gün Sonunda Kalan Miktar (%)	2 Gün Sonunda Kalan Miktar (%)	3 Gün Sonunda Kalan Miktar (%)	4 Gün Sonunda Kalan Miktar (%)	5 Gün Sonunda Kalan Miktar (%)	6 Gün Sonunda Kalan Miktar (%)	8 Gün Sonunda Kalan Miktar (%)	10 Gün Sonunda Kalan Miktar (%)
F10-1	100	23,697	23,660	23,568	22,623	22,429	22,381	22,536	22,777
SS	-	2,087	2,108	2,113	3,513	3,569	3,629	3,478	3,492
RSS	-	8,809	8,908	8,966	15,528	15,915	16,215	15,434	15,331
F10-2	100	27,023	26,910	26,591	25,861	24,616	22,780	22,202	22,035
SS	-	2,292	2,246	2,353	2,662	3,567	5,188	4,624	3,899
RSS	-	8,481	8,347	8,848	10,293	14,489	22,772	20,827	17,695
F10-3	100	25,389	23,940	23,863	23,159	21,538	14,132	13,778	10,965
SS	-	1,110	3,253	3,459	3,219	3,624	4,104	3,728	3,590
RSS	-	4,371	13,588	14,497	13,901	16,825	29,041	27,061	32,739
F10-4	100	29,067	18,410	17,545	16,312	13,978	10,396	7,409	7,372
SS	-	0,174	0,911	1,115	1,320	2,654	5,276	2,710	2,761
RSS	-	0,597	4,949	6,355	8,092	18,990	50,752	36,583	37,454
F10-5	100	29,606	16,266	14,795	12,950	10,690	5,808	5,790	5,712
SS	-	3,467	2,274	2,119	2,751	4,224	1,174	1,181	1,203
RSS	-	11,710	13,983	14,325	21,244	39,518	20,218	20,399	21,058

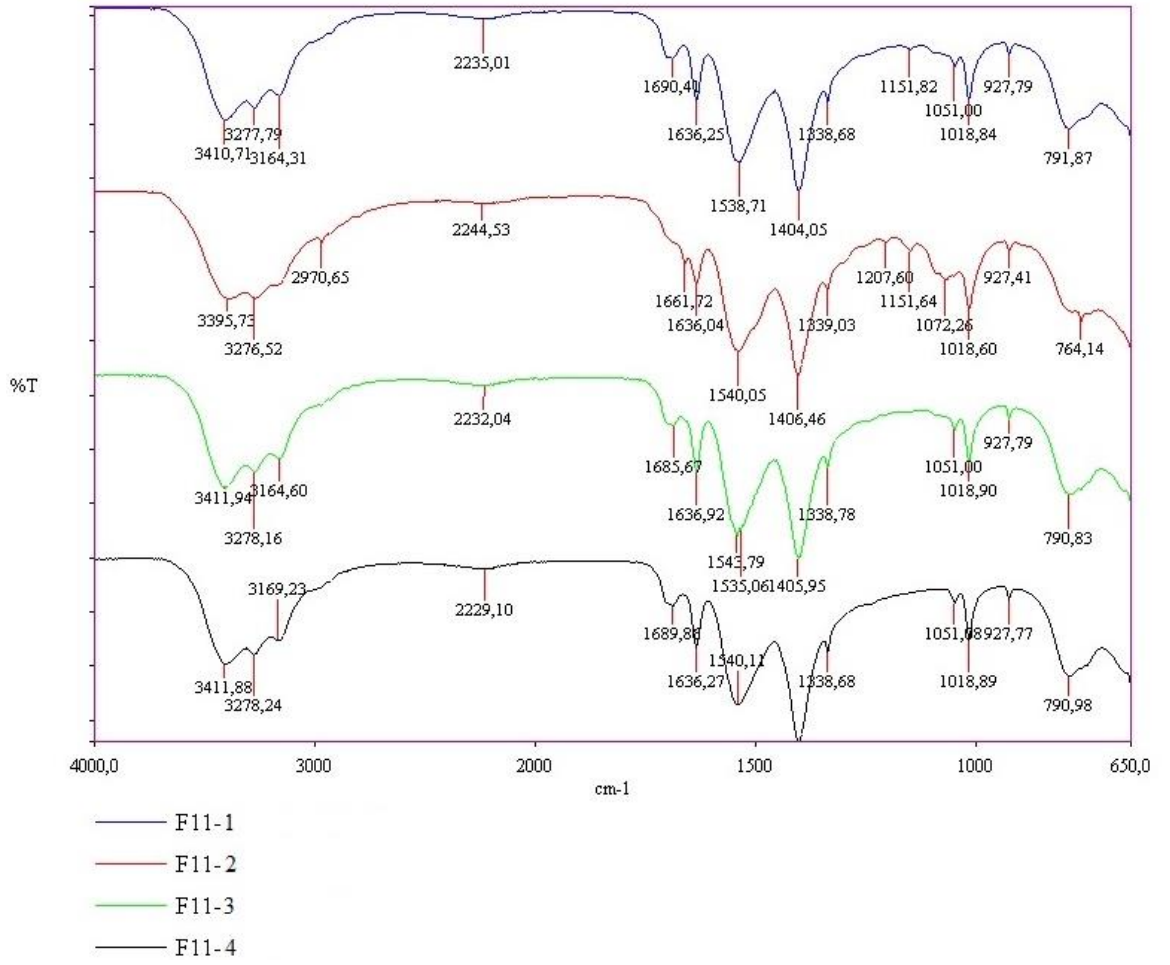


Şekil 34. Skafold enzimatik degradasyon yüzde değişim grafiği. 1., 2., 3., 4., 5., 6., 8., ve 10. günler sonunda skafodlarda meydana gelen ağırlık azalması yüzde cinsinden ifade edilmiştir.

3.5.2. Etken madde yüklenmiş skafoldların karakterizasyonu

3.5.2.1. Skafoldların FT-IR spektrometre ile değerlendirilmesi

Hazırlanan skafoldların FT-IR ile karakterizasyonu Bölüm 2.2.5.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş olup sonuçlar Şekil 35'te sunulmuştur. Spektrumlar incelendiğinde Bölüm 3.5.1.1'de bildirilen etken madde içermeyen formülasyonlara ait spektrumlar ile uyumlu oldukları görülebilmektedir. Etken maddelere ait karakteristik pikleri içermemesi etken maddelerin formülasyonda bulunma oranının düşüklüğüne bağlanmış olup, maddeler arası geçimsizlik olarak değerlendirilebilecek bir pike de rastlanmamıştır.



Şekil 35. Etken madde içeren skafold formülasyonlarının FT-IR spektrumları

3.5.2.2. Skafoldlara ilaç yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi

Hazırlanan skafoldlara yüklenen etken madde miktarları ve işlem etkinlikleri Bölüm 2.2.5.2.2’de anlatıldığı şekilde hesaplanmış olup Tablo 12 ve Tablo 13’te gösterilmiştir. Hesaplamalar sonucu elde edilen veriler ile bu verilerin standart sapma ve güven sınırı değerleri bulunmuştur.

Tablo 12. Formülasyon çalışmalarında elde edilen skafold formülasyonlarına ait allantoin miktar tayini ve işlem etkinliği

Allantoin Miktar Tayini					
Kod	Teorik Etken Madde Miktarı (a) (%)	Ölçülen Etken Madde Miktarı (b) (%)	SS	Güven Sınırı (%95)	İşlem Etkenliği (a/b) (%)
F11-1	10,513	9,799	0,047	0,053	93,209
F11-2	10,470	9,562	0,043	0,049	91,333
F11-3	10,200	9,488	0,028	0,032	93,017
F11-4	10,647	10,071	0,012	0,013	94,607

Tablo 13. Formülasyon çalışmalarında elde edilen skafold formülasyonlarına ait lidokain HCl miktar tayini ve işlem etkinliği

Lidokain HCl Miktar Tayini					
Kod	Teorik Etken Madde Miktarı (a) (%)	Ölçülen Etken Madde Miktarı (b) (%)	SS	Güven Sınırı (%95)	İşlem Etkenliği (a/b) (%)
F11-1	10,577	9,602	0,029	0,032	90,786
F11-2	10,317	9,917	0,036	0,041	96,125
F11-3	10,590	9,519	0,036	0,040	89,887
F11-4	10,830	9,973	0,002	0,002	92,099

3.5.2.3. Analitik yöntem validasyonu

Formülasyonda kullanılan etken maddelerin miktar tayininin yapılmasında kullanılan analitik yöntemin validasyonu Bölüm 2.2.5.2.3'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.5.2.3.1. Spesifiklik

3.5.2.3.1.1. Pik tanımlaması, blank ve plasebo etkisi

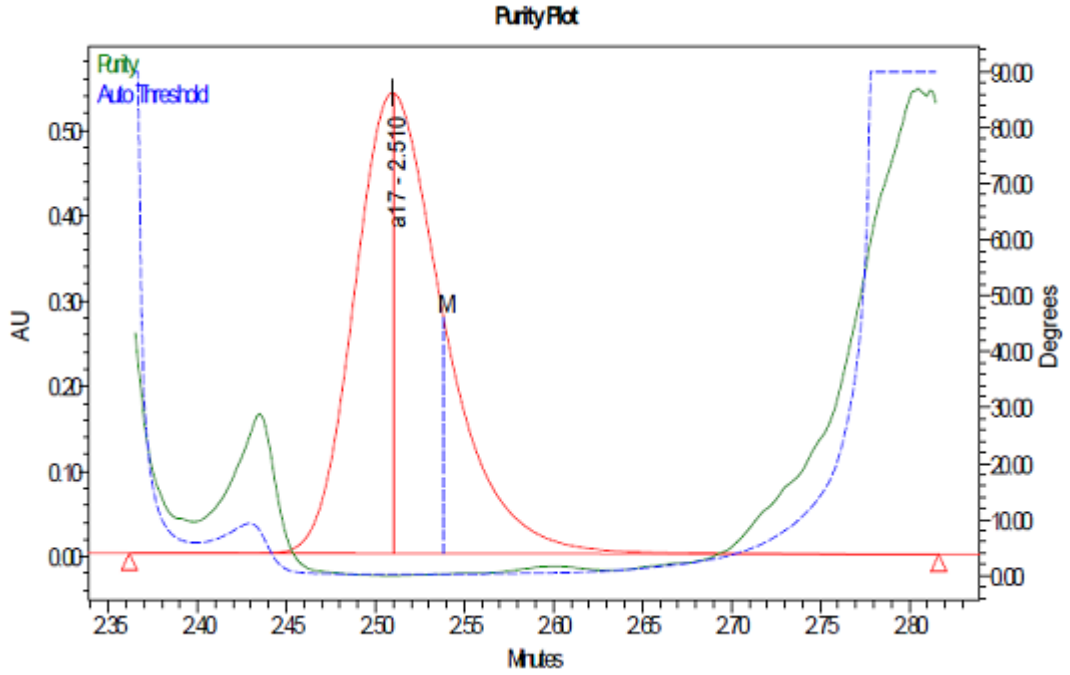
Blank çözeltisi, plasebo çözeltisi, standart çözeltisi ve test çözeltisi 2.2.5.2.3.1.1'de belirtildiği şekilde analiz edilerek herbirinden gelen pikler tespit edildi. Sonuçlar Tablo 14'de, ilgili kromatogramlar Şekil 36, Şekil 37 ve Şekil 38'de verilmiştir.

Tablo 14. Pik Tanımlaması, Blank ve Plasebo Etkisi Testi Sonuçları

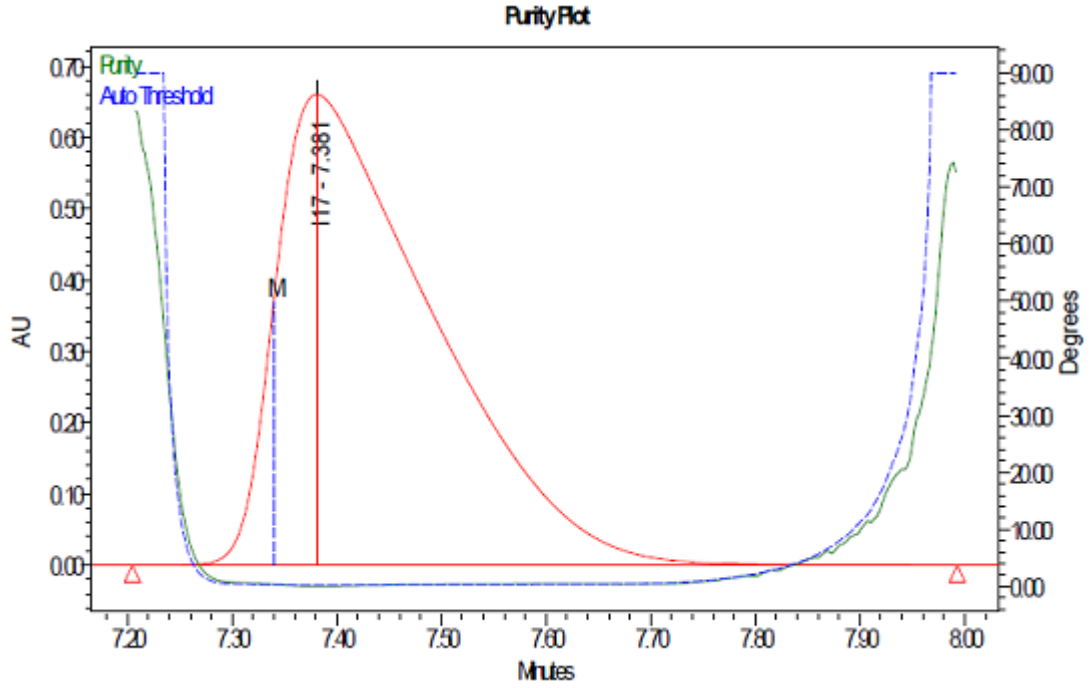
Numune adı	RT*	Saflık Açısı	Saflık Eşiği
Blank çözeltisi	-	-	-
Plasebo çözeltisi	-	-	-
Standart çözeltisi (Allantoin)	2,509	0,211	0,297
Standart çözeltisi (Lidokain HCl)	7,383	0,201	0,313
Test çözeltisi (Allantoin)	2,510	0,189	0,297
Test çözeltisi (Lidokain HCl)	7,381	0,220	0,329

*RT: Alıkonma zamanı

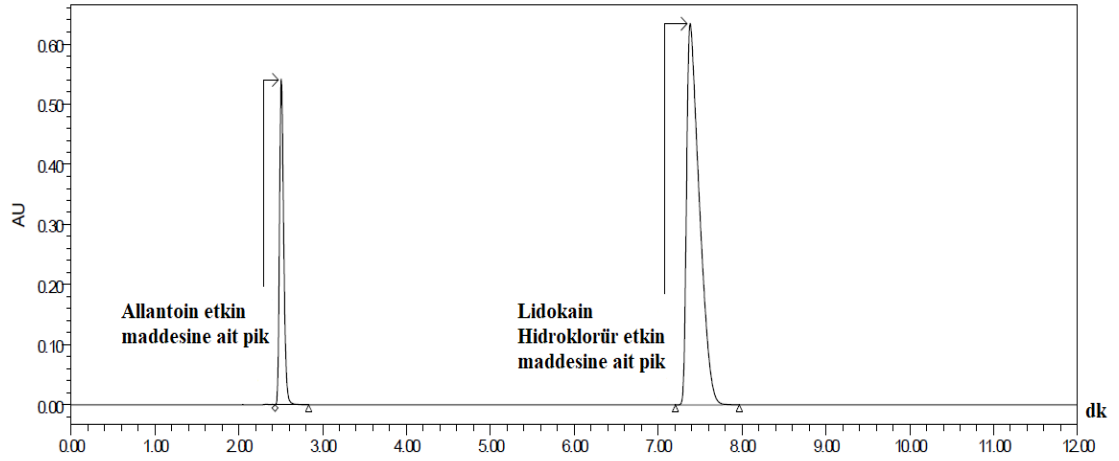
Etken maddelerin alıkonma zamanlarında plasebodan ve çözücüden gelen herhangi bir pik tespit edilmemiştir. Ana pikin, safsızlık pikinden ayrıldığı ve tüm piklerin saf olduğu gözlenmiştir.



Şekil 36. Allantoin test piki safsızlık kromatogramı



Şekil 37. Lidokain HCl test piki safsızlık kromatogramı



Şekil 38. Test çözeltisi kromatogramı (allantoin ve lidokain HCl pikleri)

3.5.2.3.1.2. Taşınma etkisi

Bölüm 2.2.5.2.3.1.2’de belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 15’te gösterilmiştir. Taşınmanın limitler dahilinde olduğu gözlenmiştir.

Tablo 15. Taşınma etkisi sonuçları

Numune	Allantoin		Lidokain HCl	
	ALAN	% FARK	ALAN	% FARK
Standart	1947256		6780131	
Blank	0	0,000	202	0,010
Standart	1962445		6834715	
Blank	0	0,000	616	0,031
Standart	1961275		6825088	
Blank	0	0,000	432	0,022
Standart	1964367		6838052	
Blank	0	0,000	327	0,017
Standart	1957545		6811154	
Blank	0	0,000	494	0,025
Standart	1967516		6846105	
Blank	0	0,000	0	0,000

3.5.2.3.2. Sistem uygunluk

Analiz yönteminde tarif edildiği şekilde standart çözeltisi hazırlanmış ve peş peşe 6 enjeksiyon yapılmıştır. Her enjeksiyona ait alan değerleri belirlenmiştir. Allantoin için altı enjeksiyon % RSS değeri 0,1, Lidokain HCl için altı enjeksiyon %RSS değeri 0,2 olarak bulunmuştur. Sonuçların kabul kriterine uygun olduğu tespit edilmiştir.

3.5.2.3.3. Tespit limiti

Bölüm 2.2.5.2.3.3'te belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 16'da bildirilmiştir. Sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 16. Tespit limiti değerlendirmesi

	Konsantrasyon (µg/mL)	% (Test çözeltilisi konsantrasyonuna göre)	Sinyal/Gürültü
Allantoin	0,5	% 0,05	4,2
Lidokain HCl	0,1	% 0,014	5,1

3.5.2.3.4. Hesaplanabilirlik limiti

Bölüm 2.2.5.2.3.4'te belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 17'te bildirilmiştir. Sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 17. Hesaplanabilirlik limiti değerlendirmesi

	Konsantrasyon (µg/mL)	% (Test çözeltilisi konsantrasyonuna göre)	Sinyal/Gürültü
Allantoin	0,1	% 0,1	10,1
Lidokain HCl	0,3	% 0,028	10,7

3.5.2.3.5. Doğrusallık

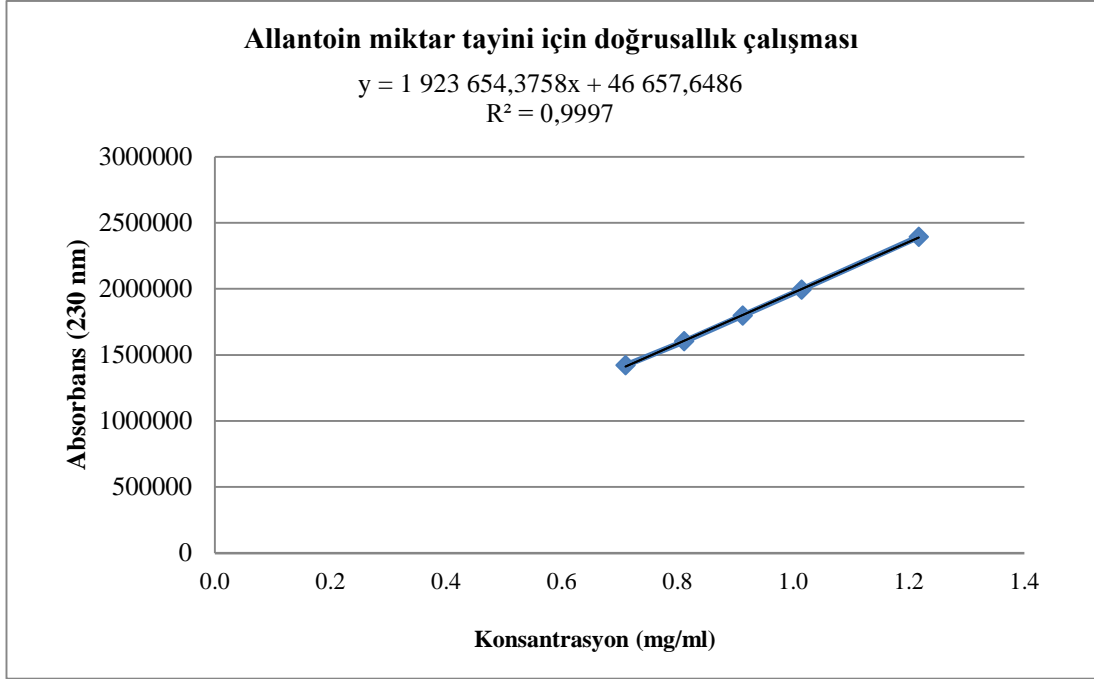
Bölüm 2.2.5.2.3.5'te belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Allantoin için r^2 değeri 0,9997, Lidokain HCl için r^2 değeri 0,9999 bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 18 ve Tablo 19'da, ilgili kalibrasyon eğrileri Şekil 39 ve Şekil 40'ta bildirilmiştir. Sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 18. Analitik yöntem validasyonu allantoin doğrusallık sonuçları

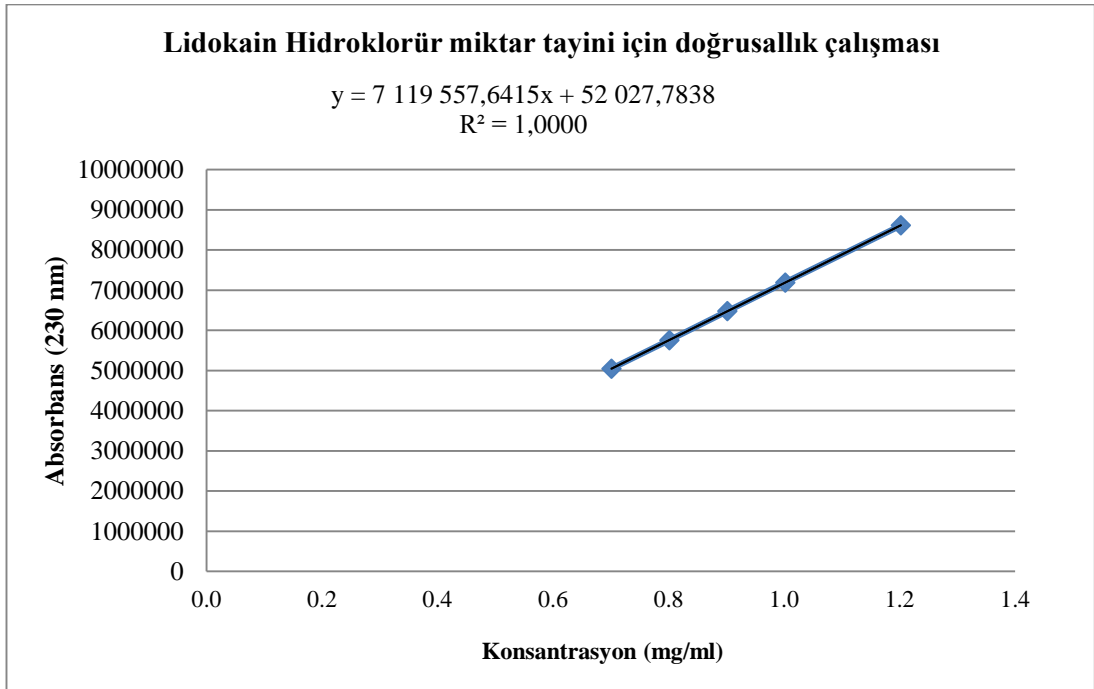
Standart Konsantrasyon Seviyesi (%)	Allantoin Konsantrasyonu (mg/mL)	Allantoin Alan
70	0,710220	1421690
80	0,811680	1602574
90	0,913140	1798542
100	1,014600	1994334
120	1,217520	2394151

Tablo 19. Analitik yöntem validasyonu lidokain HCl doğrusallık sonuçları

Standart Konsantrasyon Seviyesi (%)	Lidokain HCl Konsantrasyonu (mg/mL)	Lidokain HCl Alan
70	0,701400	5045210
80	0,801600	5756527
90	0,901800	6475328
100	1,002000	7187765
120	1,202400	8610774



Şekil 39. Analitik yöntem validasyonu allantoin doğrusallık grafiği



Şekil 40. Analitik yöntem validasyonu lidokain HCl doğrusallık grafiği

3.5.2.3.6. Uygulama aralığı

Bölüm 2.2.5.2.3.6'da belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 20'de verilmiştir. Sonuçların kabul kriterine uygun olduğu tespit edilmiştir. Etken

maddenin çalışma derişiminin % 70 ile %120 aralığı, çalışma aralığı olarak uygun bulunmuştur.

Tablo 20. Uygulama aralığı sonuçları

Ölçüm Sayısı	Allantoin (Alan)		Lidokain HCl (Alan)	
	Min. (%70)	Max. (%120)	Min. (%70)	Max. (%120)
1	1436055	2394025	5045902	8601810
2	1426919	2397688	5040983	8611387
3	1422670	2392415	5049763	8601293
4	1412649	2389398	5034873	8608127
5	1419935	2397447	5052398	8617932
6	1411910	2393934	5047340	8624094
Ortalama	1421689,67	2394151,17	5045209,83	8610773,83
SS	9111,80	3131,83	6358,21	9014,26
RSS	0,64	0,13	0,13	0,10

3.5.2.3.7. Doğruluk ve geri elde edilebilirlik

Bölüm 2.2.5.2.3.7’de belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 21 ve Tablo 22’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunmuştur.

Tablo 21. Analitik yöntem validasyonu allantoin geri kazanım sonuçları

Seviye (%)	Geri kazanım (Allantoin) (%)	Ortalama (%)	SS	RSS (%)
70	100,42	100,2	0,2	0,2
	100,20			
	99,96			
100	99,83	99,9	0,1	0,1
	99,93			
	100,10			
130	98,98	99,1	0,2	0,2
	99,31			
	99,12			
	Ortalama (%)	99,8		
	SS	0,6		
	RSS (%)	0,6		

Tablo 22. Analitik yöntem validasyonu lidokain HCl geri kazanım sonuçları

Seviye (%)	Geri kazanım (Lidokain HCl) (%)	Ortalama (%)	SS	RSS (%)
70	100,20	100,7	0,5	0,5
	100,82			
	101,10			
100	99,73	99,8	0,3	0,3
	100,10			
	99,52			
130	99,31	99,5	0,2	0,2
	99,62			
	99,66			
	Ortalama (%)	100,01		
	SS	0,62		
	RSS (%)	0,62		

3.5.2.3.8. Kesinlik

3.5.2.3.8.1. Sistem kesinliği (tekrar edilebilirlik)

Bölüm 2.2.5.2.3.8.1’de belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Sonuçların ortalaması, standart sapma (SS) ve rölatif standart sapma (RSS) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 23’te verilmiştir. Sonuçların kabul kriterine uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 23. Sistem kesinliği değerleri

Enjeksiyon Sayısı	Allantoin Standart Çözeltisinin Alanı	Lidokain HCl Standart Çözeltisinin Alanı
1	1989660	7169118
2	1992645	7179661
3	1996963	7192680
4	1994845	7191359
5	1996558	7198914
6	1995334	7194858
Ortalama	1994334,2	7187765
SS	2750,20	11180,97
RSS %	0,14	0,16

3.5.2.3.8.2. Yöntem kesinliği (tekrar elde edilebilirlik)

Bölüm 2.2.5.2.3.8.2'ye uygun olarak miktar tayini numunesi hazırlanıp analiz edilmiş ve kabul kriterlerine uygunluğu test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 24'te verilmiştir. Elde edilen bu veriler analitik yöntemin allantoin – lidokain HCl miktar tayinini güvenilir biçimde yaptığını göstermektedir.

Tablo 24. Analitik Yöntem Validasyonu Yöntem Kesinlik Sonuçları

Cihaz	Kolon	Test	Sonuç (mg Allantoin)	Sonuç (mg Lidokain HCl)
WATERS HPLC System	<i>Inertsil ODS-4, 250 mm x 4.6 mm, 5µm</i> <i>Seri No: 4BF37008</i>	1	5,313(%93.5)	5,202(%93.2)
		2	5,337(%93.9)	5,157(%92.4)
		3	5,353(93.2)	5,173(%92.7)
		Ortalama	5,33	5,18
		SS	0,02	0,02
		RSS %	0,37	0,44

3.5.2.3.9. Sağlamlık

3.5.2.3.9.1. Çözelti stabilitesi

Bölüm 2.2.5.2.3.9.1’de belirtildiği şekilde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar 25 °C’de allantoin ve lidokain HCl test çözeltisinin 48 saat stabil olduğunu göstermektedir.

3.5.2.4. Skafoldların etken madde salım özelliklerinin değerlendirilmesi

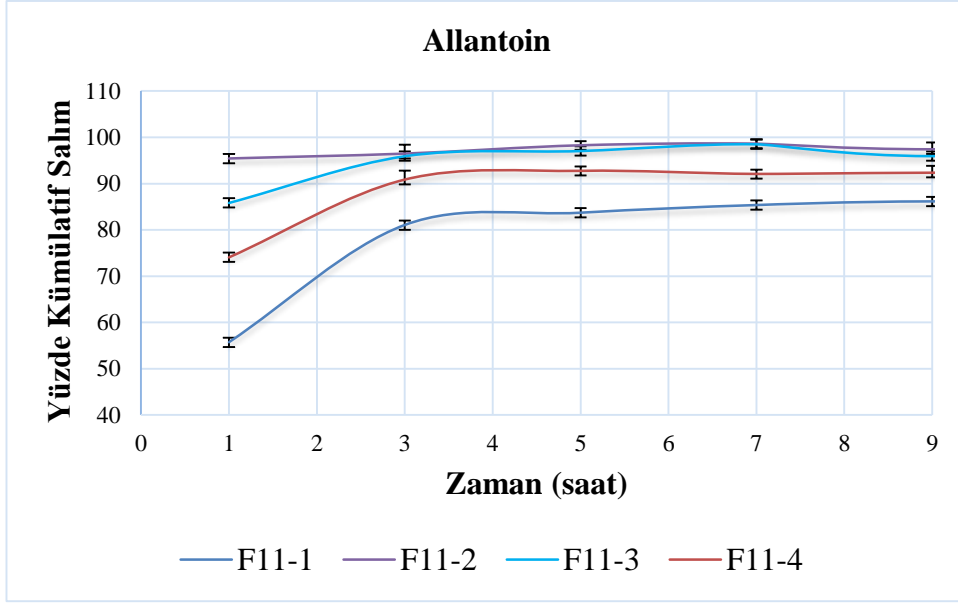
Skafoldların salım özellikleri bölüm 2.2.5.2.4’te belirtildiği şekilde PBS tamponunda çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 25 ve Tablo 26’da ve salım grafikleri de Şekil 41 ve Şekil 42’de gösterilmiştir. Skafoldlardan etken madde salım kinetikleri Tablo 27’de sunulmuştur.

Tablo 25. Allantoin salım çalışması sonuçları

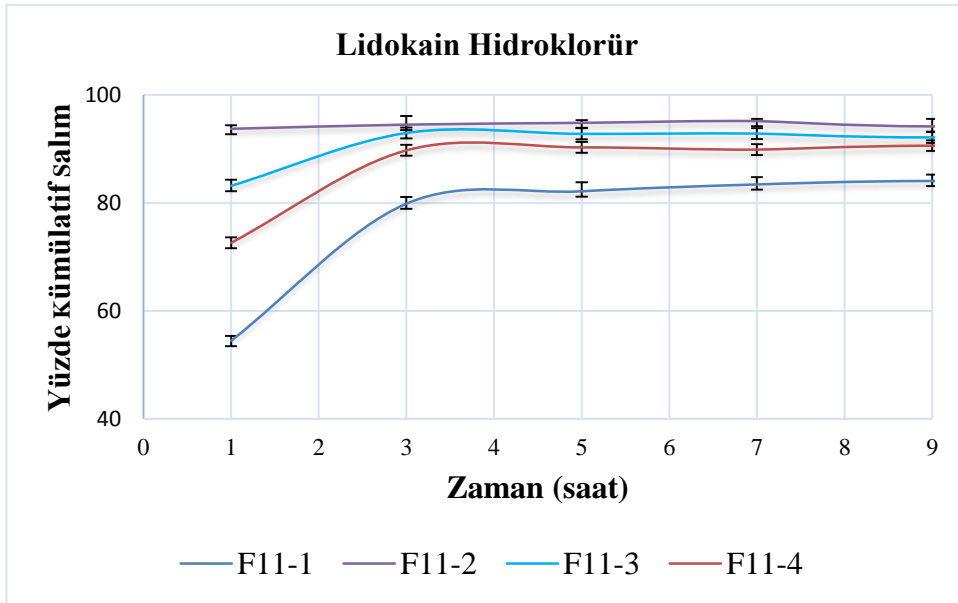
Formülasyon Numarası		1.saat	3. saat	5.saat	7.saat	9.saat
F11-1	Ortalama	55,706	81,040	83,692	85,348	86,136
	SS	0,461	0,321	0,769	0,690	0,591
	RSS	0,828	0,396	0,919	0,809	0,686
F11-2	Ortalama	95,405	96,460	98,269	98,627	97,398
	SS	1,026	1,949	0,923	0,931	1,461
	RSS	1,075	2,021	0,939	0,944	1,500
F11-3	Ortalama	85,846	95,941	97,065	98,520	95,965
	SS	0,366	0,375	1,752	0,945	0,274
	RSS	0,427	0,391	1,805	0,960	0,286
F11-4	Ortalama	74,067	90,862	92,756	92,088	92,350
	SS	10,572	1,408	0,407	1,446	1,255
	RSS	14,273	1,550	0,439	1,571	1,359

Tablo 26. Lidokain HCl salım çalışması sonuçları

Formülasyon Numarası		1.saat	3. saat	5.saat	7.saat	9.saat
F11-1	Ortalama	54,474	79,889	82,182	83,449	84,097
	SS	0,882	1,220	1,643	1,304	1,183
	RSS	1,618	1,527	1,999	1,563	1,406
F11-2	Ortalama	93,740	94,515	94,853	95,179	94,187
	SS	0,655	1,598	0,468	0,369	1,364
	RSS	0,699	1,691	0,493	0,388	1,449
F11-3	Ortalama	83,177	92,978	92,806	92,866	92,150
	SS	1,124	0,976	1,128	1,008	0,980
	RSS	1,352	1,050	1,215	1,085	1,063
F11-4	Ortalama	72,618	89,756	90,307	89,892	90,620
	SS	9,643	1,164	1,055	1,248	1,220
	RSS	13,280	1,297	1,168	1,389	1,346



Şekil 41. Allantoin salım grafiği



Şekil 42. Lidokain HCl salım grafiği

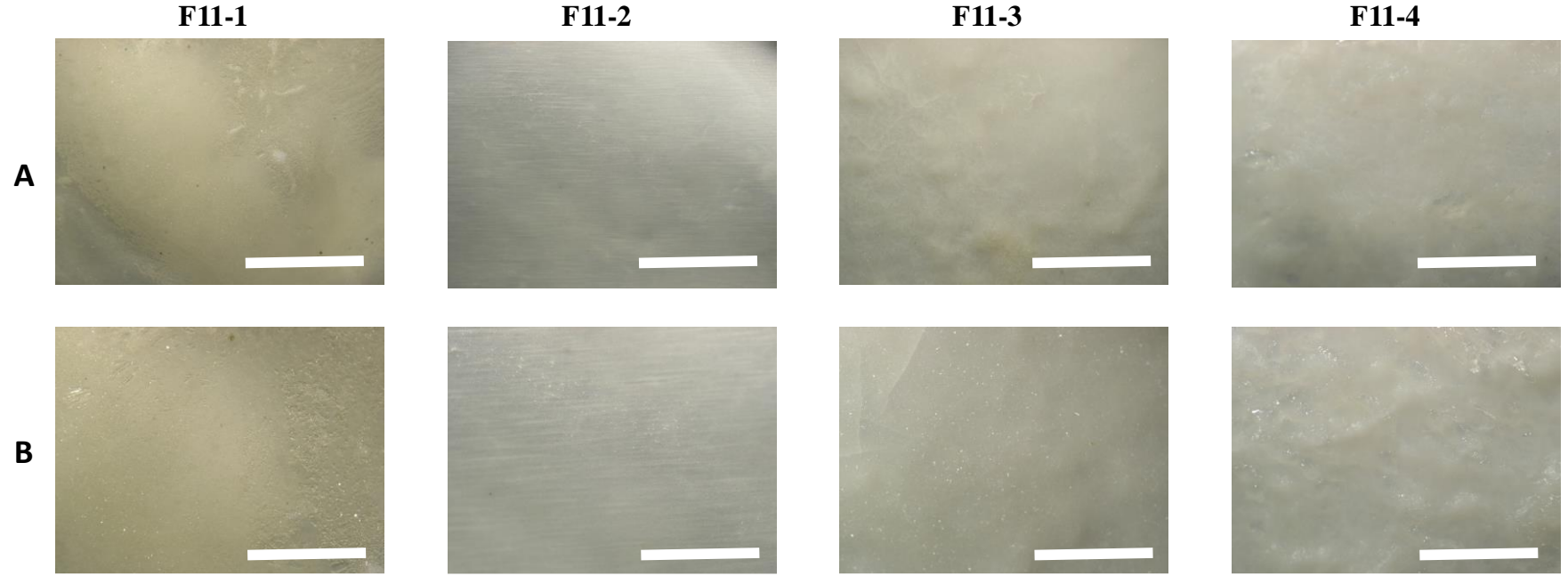
Tablo 27. Skafoldların salım modellerine göre değerlendirilmesiyle elde edilen R² değerleri

Salım modeli	Allantoin R ²				Lidokain HCl R ²			
	11.1	11.2	11.3	11.4	11.1	11.2	11.3	11.4
0. derece	0,65	0,55	0,51	0,54	0,62	0,53	0,44	0,19
1. derece	0,62	0,46	0,51	0,55	0,60	0,53	0,44	0,19
Higuchi	0,77	0,69	0,66	0,65	0,75	0,67	0,58	0,30
Korsmeyer-Peppas	0,87	0,82	0,93	0,72	0,86	0,80	0,73	0,41
Hickson-Crowell	0,63	0,55	0,51	0,54	0,61	0,53	0,44	0,19

3.5.2.5. Skafoldların fiziksel görünümünün optik mikroskop ile değerlendirilmesi

Numune yüzeylerinde makroskobik değerlendirilmesi için dijital kameraya bağlanmış (Olympus C-5060) optik mikroskop (Olympus SZX7) kullanılmıştır.

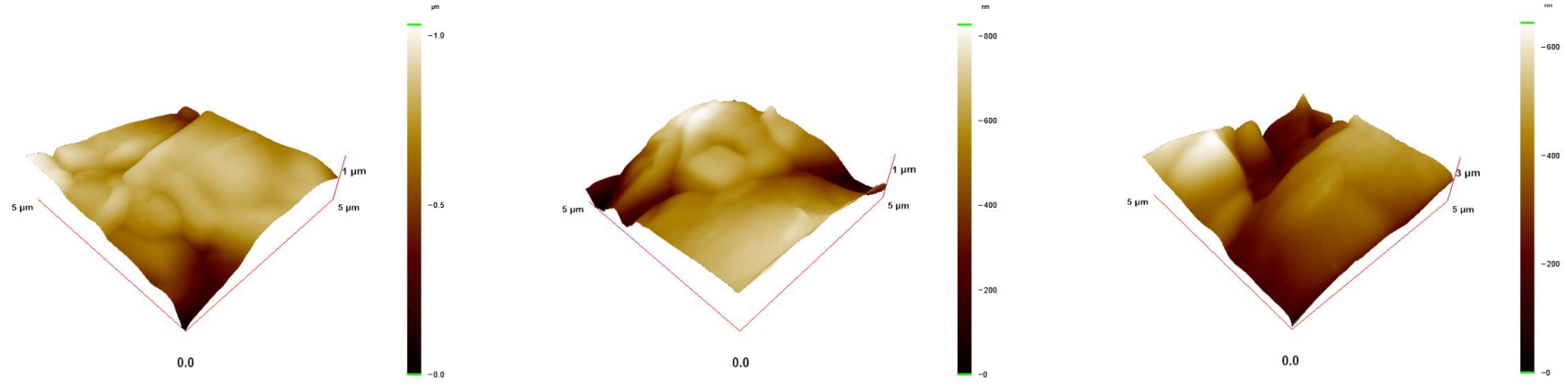
Elde edilen verilere göre, ilaç yüklenmemiş skafoldlarla elde edilen verilere benzer şekilde ilaç yüklü F11 numaralı skafoldların yüzeylerinde de makroskobik çatlakların ve büyük boyutta düzensizliklerin olmadığı saptanmıştır (Şekil 43).



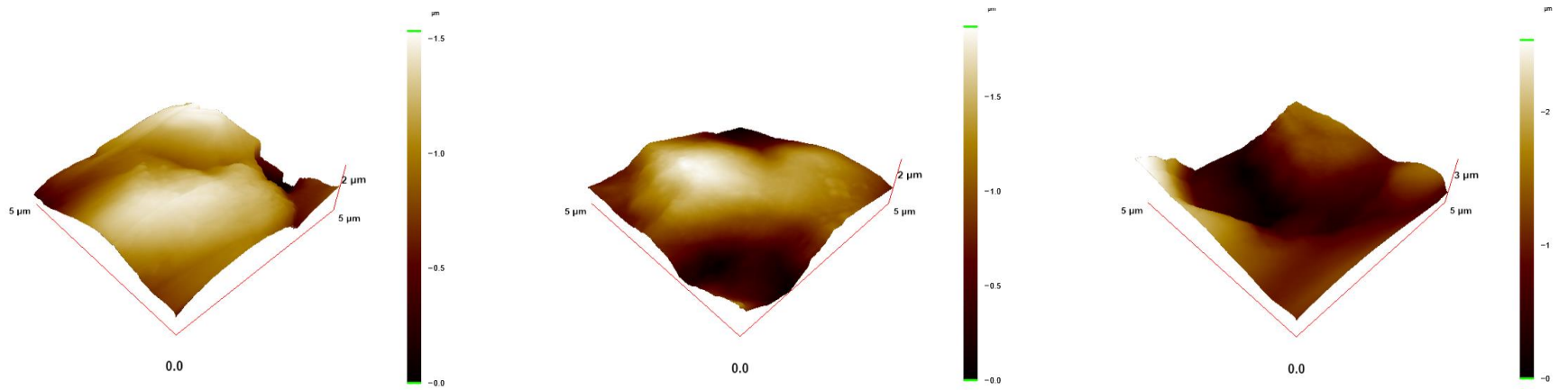
Şekil 43. F11-1, F11-2, F11-3 ve F11-4 numaralı formülasyonların optik mikroskop görüntüsü (Ölçek: A serisi için 4 mm, B serisi için 2 mm)

3.5.2.6 Skafoldların AFM ile karakterizasyonu

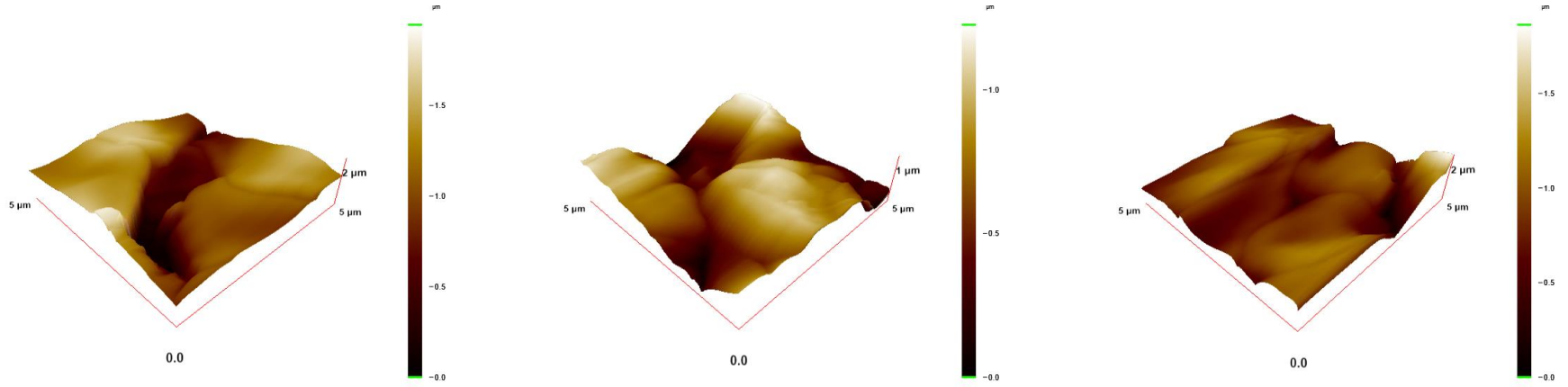
Hazırlanan skafoldların AFM ile karakterizasyonu Bölüm 2.2.5.2.6'da anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş olup Şekil 44-47'de gösterilmiştir.



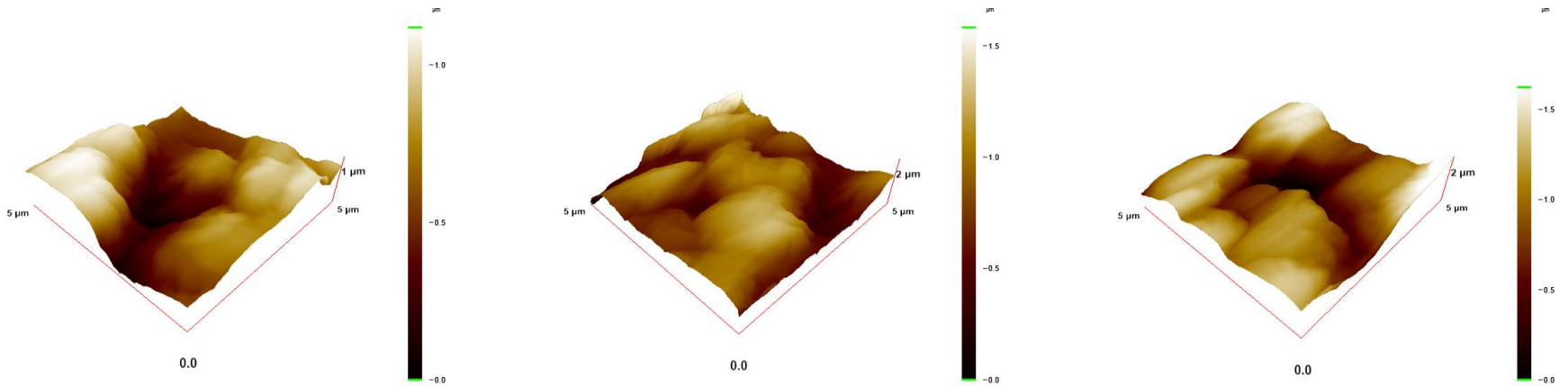
Şekil 44. F11-1 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)



Şekil 45. F11-2 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 µm x 5 µm tarama)



Şekil 46. F11-3 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 μm x 5 μm tarama)



Şekil 47. F11-4 numaralı formülasyon yüzeyin 3 farklı bölgesi incelenerek elde edilen 3B AFM görüntüleri (5 μm x 5 μm tarama)

3.6. Stabilite Çalışması

Scaffold formülasyonunun stabilite çalışması bölüm 2.2.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 27'de gösterilmiş olup, miktar tayini sonuçlarındaki değişim %5' ten fazla bulunmayarak ICH gerekliliklerini sağlamaktadır (ICH, Q1A(R2)). Alüminyum blister folyo içinde bekletilen scaffoldların fiziksel görünümünde uygunsuz bir durum tespit edilmemiştir.

Tablo 28. F11-4 numaralı formülasyon için stabilite sonuçları (miktar tayini çalışması)

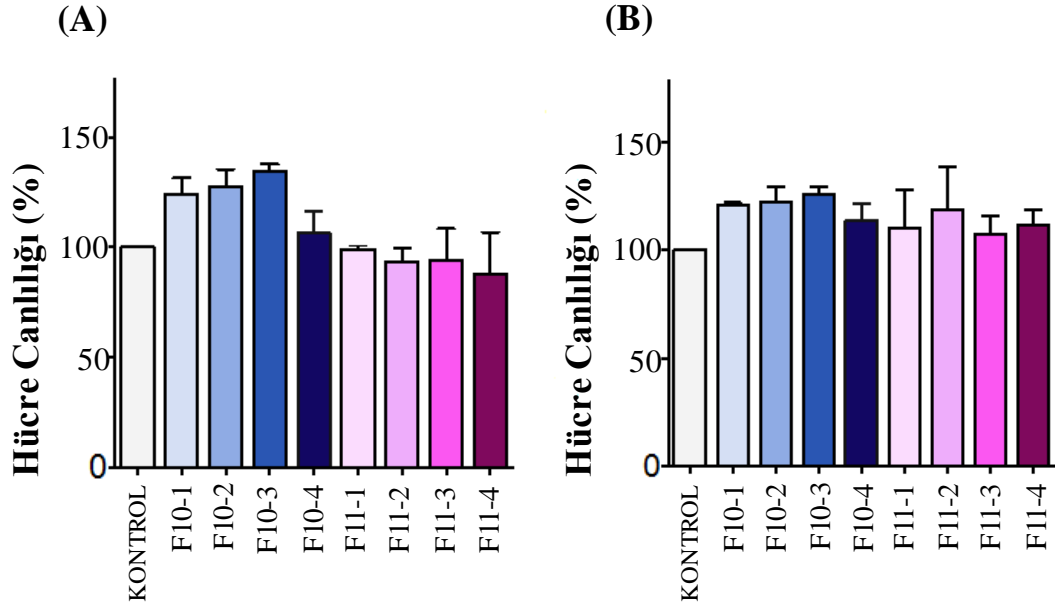
Kod	Allantoin 0. ay Miktar Tayini Sonucu	Lidokain HCl 0.ay Miktar Tayini Sonucu	Allantoin 3. ay Miktar Tayini Sonucu	Lidokain HCl 3.ay Miktar Tayini Sonucu	Allantoin için Yüzde Değişim Sonuç	Lidokain HCl için Yüzde Değişim Sonuç
F11-4/1	9,799	9,602	9,673	9,449	1,286	1,593
F11-4/2	9,562	9,917	9,207	9,437	3,713	4,840
F11-4/3	9,488	9,519	9,576	9,431	-0,927	0,924
Ortalama	10,071	9,973	9,485	9,439	1,357	2,453
SS	0,162	0,210	0,246	0,009		
RSS	1,613	2,105	2,592	0,097		

3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Etken madde yüklü olan ve olmayan tüm örneklerin sitotoksosite analizleri Bölüm 2.2.7'de belirtildiği şekilde MTT yöntemi ile mikropłaka okuyucuda gerçekleştirildi. Literatürde de konu ile ilgili çalışmalardan yola çıkarak, hücre kültürü çalışmaları MKH kullanılarak gerçekleştirdi (Grier ve ark., 2018; Monnier ve ark., 2018; Alavarse ve ark., 2017).

MKH hücreleri ile 24 saat inkübe edilen F10-1, F10-2, F10-3 ve F10-4 numunelerinde sırasıyla %124, %128, %135 ve %107 yaşayabilirlik görülürken; 48 saat inkübe edilen aynı numunelerde hücre yaşayabilirliği sırasıyla %122, %123, %126 ve %115 olarak gözlenmiştir. Etken madde yüklü (allantoin ve lidokain HCl)

F11-1, F11-2, F11-3 ve F11-4 numunelerinin MKH hücreleri üzerindeki sitotoksiteleri incelendiğinde ise; toksik olmadıkları, fakat biyoyumluluklarının etken madde yüklü olmayan numunelere göre daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 48).



Şekil 48. Etken madde yüklü olan ve olmayan hidrojel ürünlerinin 24 saat (A) ve 48 saat (B) inkübasyon süresi sonundaki MKH hücreleri üzerindeki hücre canlılığı sonuçları.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yara iyileşmesi yara oluşumundan sonra, dokunun eski haline gelmesi esnasında tüm olayları kapsayan bir süreçtir. Bu süreçteki onarım mekanizmaları karmaşık olup, farklı hücre ve dokuların birlikte çalışmasını gerektirir (Martin, 1997). Yara iyileşmesi adımlarından en önemlisi rejenerasyon yani hücre büyümesi ve yenilenme sürecidir. Rejenerasyon sürecinde zedelenen hücre parankimal hücreler tarafından yenilenir. Yara iyileşme sürecinde, ilk basamaklarda dolaşım düzenlenir ve pıhtı oluşumu sağlanır. Böylece kan kaybı engellenmiş olur. İkinci aşamada makrofajlar, nötrofiller ve fibroblastlar ile immün sistem devreye girer. Bir sonraki aşama fibroplazi ve granülasyon dönemidir. Sonrasında fibroblast proliferasyonu ile yeni epitel dokusu oluşmaya başlar. En son aşamada ise kollajen fibrillerinin üretilmesi ile yara iyileşmesi tamamlanmış olur (Rogers ve Jeschke, 2016; Martin, 1997).

Yara iyileşmesi süresince doku dehidratasyonunu önlemek, hücre canlılığını-çoğalmasını desteklemek, anjiogenezi uyarmak, ölü hücrelerin uzaklaştırılmasını hızlandırmak, büyüme faktörlerinin hedef hücrelere bağlanmasını kolaylaştırmak, enfeksiyon riskini azaltmak ve hastanın daha az acı çekmesini sağlamak, yara bölgesinin nemli tutulmasını sağlamak gibi konuların gerekliliğinin anlaşılmasıyla birlikte yara örtüsü anlayışı da değişmiştir. Modern yara örtüleri geleneksel örtülerinden farklı olarak, iyileşme için yara tipinin ihtiyaç duyduğu uygun ortam sağlanmak suretiyle, yukarıda bahsedilen özelliklere sahip şekilde tasarlanmaktadır (S. Kumar ve ark., 2004; Boetang ve ark., 2008; Kamoun ve ark., 2017). Her ne kadar geleneksel yara örtüleri modern yara örtülerine göre daha az maliyetli görünse de uzun vadede bir değerlendirme yapıldığında, modern yara örtüleri sık sık değiştirme gerektirmedikleri ve hızlı iyileşme sağladıkları için ekonomik anlamda da daha avantajlıdır (Jones ve San Miguel, 2006). Modern yara örtüleri kapsamında; düşük yapışma özellikli ya da yapışkan olmayan tabaka halindeki örtüler, yarı-geçirgen adeziv film örtüler, hidrokolloid örtüler, hidrofiber örtüler, aljinat örtüler, hidrojel örtüler, köpük örtüler, larva örtüler ve biyolojik örtüler şeklinde bir sınıflandırma yapmak mümkündür (Vowden ve Vowden, 2017; Boetang ve ark., 2008).

Yapılan çalışma ile allantoin ve lidokain HCl yüklü kitozan-kollajen skafoldların yara iyileşmesindeki etkinliğinin *in-vitro* salım ve hücre kültürü çalışmalarıyla değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışma kapsamında kitozan ve kollajen polimerlerinin seçilmesinin nedeni, son yıllarda hem örtü materyali olarak, hem de tedaviyi hızlandırıcı etkisi ile yara iyileşmesi için biyomateryallerin kullanımının öncelik kazanmış olmasıdır. Yara örtüsü hazırlanmasında kullanılan biyomateryaller arasında fibrin, fibrinojen, kollajen, hiyalüronik asit, aljinatlar, kitin, kitozan ve elastin gibi doğal polimerler önemli yer tutmaktadır. Bu doğal örtü materyalleri yara tedavisinde topikal olarak uygulanan diğer sistemlerden ve diğer yara örtülerinden farklı olarak; biyolojik açıdan uyumlu olmaları, minimum toksisiteye ve immünojeniteye sahip olmaları, antimikrobiyaller, büyüme faktörleri ya da doğal ekstrasellüler matris bileşenleri ihtiva edebilmeleri bakımından üstünlüklere sahiptirler (Kurtoğlu ve Karataş, 2009; Sezer, 2006). Çalışmamızda da bu avantajları göz önünde bulundurularak doğal polimerler tercih edilmiştir.

Yara iyileşmesinin proliferatif evresinde granülasyonu arttırdığı bilinen kitozan yara ve yanıkların tedavisinde ve kemik iyileşmesinde kullanılmaktadır (Boetang ve ark, 2008; Şenel, 2014). İlave olarak hemostatik ve yara iyileşmesini hızlandırıcı etkileri bildirilmiştir (Paul ve Sharma, 2004; Brown ve ark., 2009). Ayrıca yüksek absorpsiyon kapasitesi eksudalı yaralarda kullanılabilirliğini arttırmaktadır (Rubina ve ark., 2016). Kitozan kullanılarak antifungal ve antimikotik etki gösteren formülasyonlar elde edilebileceği gibi bakteriyostatik etkileri de literatürde bildirilmiştir (Sezer, 2006; Şenel, 2014). Antiseptik ajanların çoğunun deri üzerindeki toksik etkileri ve bakteri direnci göz önünde bulundurulduğunda formülasyonda antimikrobiyal etken madde kullanmak yerine biyoyumlu aynı zamanda da antimikrobiyal özellikteki kitozanın tercih edilmesi önem kazanmaktadır (Lawrence 1994).

Kollajen biyoparçalanabilir ve biyoyumlu olması, dokuları onarıcı özelliği bulunması, düşük antijen özellik göstermesi ile cerrahide konvansiyonel yöntemlerin yetersiz kaldığı ya da etkili bulunmadığı yaraların tedavisinde kullanılan skafoldların

formülasyonunda sıklıkla tercih edilebilecek nitelikte bir polimerdir (Wahyudi ve ark., 2016; Fan ve ark., 2016).

Literatürde de kitozan ve kollajenin birbirleri ile (Ramasamy ve Shanmugam, 2015; Fan ve ark., 2016) ya da farklı polimerlerle kombinasyonları sonucu oluşturulmuş yara örtüleri tek başına kullanıldıkları yara örtülerine göre daha sağlam ve etkili bulunmuş (Ti ve ark., 2014; JH ve ark., 2000; Xie ve ark., 2018), doğada birlikte bulunmayan kollajen ve kitozanın birlikte kullanılması yeni yapı ve mekanik özelliklere sahip hibrit bir materyal ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Rubina ve ark., 2016). Bu durum değerlendirildiğinde kitozan ve kollajeni birlikte içeren formülasyonların hazırlanması, kontrol grubu olarak da kitozan ve kollajeni tek başına içeren skafoldlar ile çalışmalar yapılması uygun görülmüştür.

Etken madde olarak allantoin tercih edilmiştir. Allantoin doku yenileyici özellikleri bulunan güvenli ve toksik olmayan bir etken maddedir (da Silva ve ark., 2018). Literatürde aynı zamanda allantoinin antiinflamatuvar ve antinosiseptif özellikte olduğu da bildirilmiştir (Lee ve ark., 2010; Florentino ve ark., 2016). Bu özellikleri ile yara iyileşmesi sürecine destek olacağı düşünülerek formülasyonda kullanılmasına karar verilmiştir.

Allantoine ek olarak formülasyona hasta uyuncunu iyileştirmek amacıyla lidokain HCl ilave edilmiştir. Lidokain HCl etkili ve güvenilir hidrofilik yapıda lokal anestetik özellikte bir etken maddedir. Açık yaraların tedavisinde ve cerrahide sıklıkla kullanılmaktadır. Çabuk başlayan etkisi ve düşük toksisite göstermesi gibi diğer olumlu özellikleri düşünüldüğünde lokal topikal taşıyıcı sistemlerinde kullanımı cazip hale gelmektedir (Das ve ark., 2013).

Literatür araştırması sonucu belirlenmiş olan formülasyon bileşenlerinin fizikokimyasal özelliklerinin tespit edilmesi amacıyla deneylere ve bu iki etken maddenin miktar tayinin yapılabilmesi için kullanılacak HPLC yönteminin geliştirilmesi ve validasyonu çalışmalarına başlanmıştır. Analizlerde kullanılacak metotların belirlenmesinde farmakope ve literatürden yola çıkılmıştır. Allantoinin çözünürlük çalışmasında Avrupa farmakopesi allantoin monografi miktar tayini bölümünde belirtilen potansiyometrik titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Çözünme

ortamı olarak *in-vitro* salım çalışmaları düşünülerek PBS pH:7,4 belirlenmiştir. Allantoin bu ortamdaki çözünürlük değeri $11,583 \pm 0,244$ mg/mL bulunmuş olup bu değer literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (<http://chemagent.ru/prodavtsy/download/1583/1463/19>, Erişim tarihi: 8 Temmuz 2018). Allantoinin erime noktası tayini sonucu 225 °C’de eridiği tespit edilmiştir ve bu sonuç EP 9.0 monografında bildirilen değer ile uyumlu bulunmuştur. Allantoinin kurutma kaybı tayini sonucu %0,016 olarak bulunmuştur. EP 9.0’da allantoinin kurutma kaybı sonucunun %0,1’den az olması gerektiği bildirildiğinden sonuç literatür ile uyumludur (EP 9.0 Allantoin Monograph). Allantoinin FT-IR analizi yapılmıştır. FT-IR analizi sonucu görülen piklerin (Şekil 13) allantoinine ait olduğu ve allantoinin saf olduğu literatür ile doğrulanmıştır (Alam ve Ahmad, 2015).

Lidokain HCl’nin çözünürlük çalışmasında çözünme ortamı olarak *in-vitro* salım çalışmaları düşünülerek PBS pH:7,4 belirlenmiştir. Lidokain HCl’nin bu ortamdaki çözünürlük değeri $104,092$ mg/ml \pm 1,096 mg/mL bulunmuştur. Lidokain HCl’nin erime noktası tayini sonucu 77 °C’de eridiği tespit edilmiştir ve bu sonuç EP 9.0 monografında bildirilen 74 °C – 79 °C aralığı içindedir. Lidokain HCl’nin su içeriği tayini sonucu %6,3 olarak bulunmuştur. EP 9.0’da etken maddenin kurutma kaybı sonucunun %5.5 – %7.0 arası olması gerektiği bildirildiğinden sonuç literatür ile uyumludur (EP 9.0 Lidocaine Hydrochloride Monograph). Lidokain HCl’nin FT-IR analizi yapılmıştır. FT-IR analizi sonucu görülen piklerin (Şekil 14) lidokain HCl’e ait olduğu ve lidokain HCl’nin saf olduğu literatür ile doğrulanmıştır (Badawi ve ark., 2016).

Formülasyonda kullanılan polimerler olan kollajen ve kitozanın da FT-IR spektrumları incelenmiş ve elde edilen verilerin bu polimerlerin karakteristik FT-IR spektrumları ile uyumlu olduğu saptanmıştır.

Fizikokimyasal özellikleri uygun bulunan etken maddeler ve formülasyon bileşenlerinin birlikte kullanılmasının uygun olduğunun ispatlanması amacıyla geçimlilik çalışmalarına geçilmiştir. Geçimlilik çalışmaları tasarlanan preparatın stabilitesi ile ilgili de bilgi verici niteliktedir. Bu çalışma kapsamında allantoin, lidokain HCl ve kütlece eşit miktarda Allantoin-Lidokain HCl içeren toz karışımının karşılaştırılmalı DSC termogramları, IR spektrumları ve TAM-IV grafikleri

yorumlanmış olup, etken maddeler arasında geçimsizlik olarak değerlendirilebilecek bir bulguya rastlanmamıştır (Şekil 17-20). Polimerler arası ve formülasyon bileşenlerinin tamamı arasındaki geçimliliğin değerlendirilmesi için de fiziksel karışımlar hazırlanarak IR ölçümleri yapılmış ve formülasyon bileşenlerinin geçimli olduğu sonucu elde edilmiştir (Şekil 21-22).

Sonuçların uygun bulunmasını takiben önformülasyon ve formülasyon çalışmalarına başlanmıştır. Bu aşamada skafoldların hazırlanması için sığır aşıl tendonundan elde edilen kollajen 0,5 M asetik asit çözeltisi içinde derişimi 1 mg/mL olacak şekilde çözündürülmüştür. Bu halde kollajen çözeltide monomer halinde bulunacağından 1 M NaOH ile damla damla eklemek ve manyetik karıştırıcıda 1000 rpm hızda karıştırmaya devam etmek suretiyle nötralizasyonu yapılmıştır. Çözelti bu şekilde 72 saat oda sıcaklığında karıştırılmış ve gözlenmiştir. (Yuan ve ark., 2013; Ti ve ark., 2014; Ravindran ve ark., 2010). Kollajenin yeterince çözünmemesi sonucu karıştırma işleminin literatürden yola çıkılarak 4°C’de su banyosunda tekrarlanmasına karar verilmiştir. Kollajen zor çözünen bir polimerdir, karıştırma sıcaklığının düşürülmesi ile uzun karıştırma süresi sürecinde polimerin stabilitesini koruması ve jelleşmesinin önlenmesi amaçlanmıştır (Caliari ve ark., 2011; Doyle, 2017). 24 saat karıştırma süresi sonunda istenilen çözünme gerçekleşmiştir. Daha sonra hazırlanan formülasyonlarda formülasyonların, polimerlerin jelleşmesi nedeniyle manyetik karıştırıcıda homojen karışmayabileceği düşünülmüş ve bu durumu düzeltmek amacıyla homojenizatör kullanımı gerekliliği ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu adım karıştırma sürecini de hızlandırmıştır. Bu şekilde diğer formülasyonlara göre özellikleri iyileştirilmiş F6 kodlu formülasyonların (özellikle sadece kollajen içeren F6-5 kodlu formülasyonun) optik mikroskop görüntülerinde gözlemlenebilecek uygunsuz yüzey özelliklerinin giderilmesi de amaçlanmıştır. Benzeri bir uygulama literatürde de görülmüştür (Caliari ve ark., 2011).

Kitozan skafoldların hazırlanması için molekül ağırlığı 100.00-300.000 arasında olan toz halindeki kitozan tercih edilmiş olup kollajen için olduğu gibi 0,5 M asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Bu halde kitozan çözeltide monomer halinde bulunacağından 1 M NaOH ile damla damla eklemek ve manyetik karıştırıcıda 1000 rpm hızda karıştırmaya devam etmek suretiyle nötralizasyonu yapılmıştır. Çözelti bu

şekilde oda sıcaklığında karıştırılmış ve gözlenmiştir (Ti ve ark., 2014; Ravindran ve ark., 2010). Kitozan çözeltisi için nötralizasyon işlemi çözelti pH'sı 4,0, 6,0 ve 7,4 olacak şekilde damla damla 1 M NaOH eklenmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir (Humberto ve ark., 2015).

Kollajen/kitozan skafoldların hazırlanması için çözeltilerin ayrı ayrı hazırlanıp istenilen hacimsel oranlarda karıştırılması ile son çözeltinin elde edildiği ve üretimde iki polimer için tek çözelti hazırlığının yapıldığı çalışmalar değerlendirilmiştir.

Bahsi geçen hazırlama yöntemleri 10 mg/mL polimer konsantrasyonu ile tekrar edilmiş olup 25 °C oda sıcaklığı, 60 °C etüv ve 30 °C etüv koşullarında 4 mL polimer çözeltisi ortalama 10 mm² kadar alana sahip skafold kalıplarına dökülmüş çözeltilerin kuruma özellikleri gözlemlenmiştir. Ek olarak nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmeden polimer solüsyonları hazırlanarak değerlendirmeler yapılmıştır (Tablo 3). Bu çalışma ile en uygun sonuçlar iki polimer için de pH 6,0 olarak nötralizasyonun yapıldığı, 30 °C etüv ortamında kurutulan, homojenizatörün kullanıldığı F10 kodlu skafoldlarda gözlemlenmiştir. Formülasyon geliştirme çalışmaları sırasında elde edilen %100 kollajen içeren F6-5 numaralı formülasyona ait optik mikroskop verisi skafoldun yüzeyel özelliklerini iyileştirmek adına homojenizatör kullanımı gerekliliğini desteklemektedir.

Önformülasyon çalışmaları sonrası optimize edilen F10 kodlu formülasyon ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.

Allantoin ve lidokain HCl etken maddeleri polimerlerin 0,5 M asetik asitte çözündürülmesi aşamasında eklenmiş olup, 1000 rpm hızda manyetik karıştırıcı ile çözelti içinde çökelti görünmeyene kadar çözündürülmüştür. Literatür de göz önünde bulundurularak yükleme dozu 100 mg polimere 5 mg Allantoin ve 5 mg Lidokain HCl tekabül edecek şekilde belirlenmiştir (<https://www.medicines.org.uk/emc/product/4821/smpc>, Erişim tarihi: 14.04.2018; Taşar ve Kayaalp, 2009) (Tablo 4).

Formülasyon çalışmalarını takiben etken madde yüklenmeden hazırlanan skafoldların karakterizasyon çalışmalarına başlanmıştır. Bu kapsamda skafoldların kalınlıklarının değerlendirilmesi, FT-IR çalışması, skafoldların fiziksel görünümünün

optik mikroskop ile değerlendirilmesi, AFM ile karakterizasyon ve skafoldların şişme özelliklerinin değerlendirilmesi, hidrolitik ve *in-vitro* degradasyon özelliklerinin incelenmesi gibi çalışmalar yapılmıştır.

Skafoldların kalınlık ölçümleri değerlendirildiğinde kalınlığın formülasyondaki kitozan miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı söylenebilmektedir (Şekil 8).

Yapılan FT-IR çalışması sonuçları literatür ile uyumlu bulunmuş ve skafold spektrumlarında beklenmeyen bir pik tespit edilmemiştir (Şekil 23) (Fernandes ve ark., 2011; Ungureanu ve ark., 2015).

Optik mikroskop ile elde edilen verilerde, ön formülasyon çalışmaları sonrasında elde edilen yüzeylerin özelliklerinin oldukça düzeldiği gözlenmiştir, numune yüzeylerinde makroskobik çatlakların, polimer kümelerinin, ve büyük boyutta düzensizliklerin olmadığı saptanmıştır (Şekil 24-26). Yüzeylerin morfolojik özelliklerini değerlendirmek amacıyla skafoldlar AFM ile değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre kitozan skafoldların yüzey pürüzlülüğü (roughness) oldukça yüksek bulunmuştur (Şekil 27). Bu, kitozanın kristal yapısından kaynaklanmaktadır ve elde edilen veri literatür ile uyumludur (Lewandowska ve ark., 2015; Rinaudo, 2006; Soni ve ark., 2016). Skafoldlardaki kitozan oranı düştükçe, yüzey pürüzlülüğünde bir azalma gözlenmiştir ve sadece kollajenden üretilen skafoldların (Şekil 31) morfolojik özelliklerinin sadece kitozandan elde edilen skafoldlardan farklı olduğu saptanmıştır.

Etken madde içermeyen skafoldlarda yapılan şişme çalışmasında ağırlıkça yüzde değişimin en fazla F10-5 kodlu formülasyonunda gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 32, Tablo 9). F10-5 kodlu formülasyonda 1. gün sonunda yüzde ağırlık değişimi 203,328'tir ve buna kollajenin çok iyi bir hidrojel olması ile yapısında çok fazla su tutabilmesinin neden olduğu düşünülmektedir. Yapısında hiç kollajen bulundurmayan F10-1 kodlu formülasyonda ise ağırlıkça değişimin 1. gün sonunda 35,518 olduğu görülmüştür. Bu formülasyonda diğer formülasyonlara göre daha düşük değer elde edilmesinin nedeni de yapısında kollajen olmaması şeklinde yorumlanmıştır. F10-1 kodlu formülasyonda ilk 24 saatten sonra meydana gelen ağırlıktaki yüzde azalışın hidrolitik degradasyona bağlı olduğu ve yapısında kollajen

içeren formülasyonlarda kollajenin yüksek oranda su tutmasının, bu formülasyonlarda zamana bağlı olarak gözlenmesi beklenen hidrolitik degradasyonu maskeleyiği düşünülmektedir.

Skafoldların 37 °C'de inkübasyona bırakılması ve daha sonra tamamen kurutularak tartılması ile yapılan hidrolitik degradasyon çalışması incelendiğinde tüm skafoldların zamanla hidrolitik degradasyona uğradığı gözlenmiştir. Elde edilen verilerden yola çıkarak formülasyonların yapısındaki kollajen oranı arttıkça, hidrolitik degradasyona daha az uğradığı saptanmıştır. Sadece kollajen kullanılarak hazırlanan F10-5 numaralı formülasyonda 1. ve 2. haftalarda, 3. haftaya ve diğer formülasyonlara kıyasla daha az ağırlık kaybının olduğu gözlenmiştir. (Şekil 33). Literatürde de yapılan bir çalışmada skafold formülasyonundaki kitozan miktarının arttıkça hidrolitik degradasyon miktarının arttığı bildirilmiştir (Niu ve ark., 2009). Kollajenaz enzimi kullanılarak yapılan enzimatik degradasyon çalışmasında literatürde de bildirildiği üzere kollajen içeriği yüksek olan F10-3, F10-4 ve F10-5 formülasyonlarında daha fazla oranda degradasyon meydana gelmiştir. Kollajenin pahalı bir materyal olması, çözünmesinin uzun sürmesi ve stabilite problemleri nedeniyle %100 kollajen içeren skafold formülasyonuna etken madde yüklenmemiştir (Ti ve ark., 2014).

Etken madde yüklenmiş skafoldlarda FT-IR çalışması, skafoldlara ilaç yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi, optik mikroskop ve AFM ile karakterizasyon, ve skafoldların etken madde salım özelliklerinin değerlendirilmesi çalışmaları yürütülmüştür. Skafoldlara ilaç yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi ve etken madde salım çalışmaları kapsamında validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Son olarak skafoldlar stabilite çalışması ve hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

Yapılan FT-IR çalışması sonuçları literatür ile uyumlu bulunmuş ve skafold spektrumlarında beklenmeyen bir pik tespit edilmemiştir (Şekil 35) (Fernandes ve ark., 2011; Ungureanu ve ark., 2015). Elde edilen FT-IR spektrumlarında etken maddelere ait karakteristik pikler gözlenmemiştir. Bu duruma etken maddelerin formülasyon içerisinde 100 mg polimere 5 mg etken madde olacak şekilde bulunmasının neden olabileceği düşünülmektedir.

Validasyonu yapılan HPLC çalışması ile lidokain HCl ve allantoin miktar tayini gerçekleştirilmiş olup, etken maddelerin skafoldlara hedeflenen oranda yüklenebildiği tespit edilmiştir (Tablo 12-13).

Lidokain HCl'nin çözünürlük, etken maddelerin miktar tayini ve *in-vitro* salım çalışmasında kullanılmak üzere HPLC cihazında analitik yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen yöntemin güvenilirliği için validasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Analitik yöntemde mobil faz olarak asetonitril ve fosfat tamponu (80:20) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 ml/dk olarak belirlenmiş ve enjeksiyon hacmi 5 µl olarak ayarlanmıştır. Allantoin ve Lidokain HCl etken maddelerinin alıkonma zamanları sırası ile 2,5 dk ve 8,7 dk olarak bulunmuştur.

HPLC yöntem validasyonunda spesifiklik, sistem uygunluk, tespit limiti, hesaplanabilirlik limiti, doğrusalık, uygulama aralığı, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık validasyon çalışmaları ICH kriterleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir (ICH, Q2(R1)).

HPLC validasyonu için yapılan spesifiklik çalışmasında etken maddelerin alıkonma zamanlarında plasebodan ve çözücüden gelen herhangi bir pik tespit edilmemiştir. Ana pikin, safsızlık pikinden ayrıldığı ve tüm piklerin saf olduğu gözlenmiştir (Tablo 14, Şekil 36-38). Bu parametre içinde taşınma etkisi de çalışılmış olup taşınmanın limitler dahilinde olduğu gözlenmiştir.

Sistem uygunluk kriterini değerlendirmek üzere yapılan çalışmada allantoin için altı enjeksiyon % RSD değeri 0,1, Lidokain HCl için altı enjeksiyon %RSD değeri 0,2 olarak bulunmuştur. Sonuçların %2'den küçük olması kabul kriterine uygun olduklarını göstermektedir.

HPLC validasyonu için yapılan teşhis ve tayin sınırları etken maddelerin çok düşük konsantrasyonlarının HPLC ile ölçümünün sağlanabildiğini göstermektedir. Yapılan çalışmada teşhis ve tayin sınırı olarak allantoin ve lidokain HCl etken maddeleri için sırası ile LOD=0,5 µg/mL, LOQ=0,1 µg/mL ve LOD=0,1 µg/mL, LOQ=0,3 µg/mL bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarla geliştirilen metot ile etken maddelerin çok düşük konsantrasyonlarının ölçülebileceği görülmüştür.

HPLC validasyonu doğrusallık çalışmaları allantoin ve lidokain HCl için 0,7, 0,8, 0,9, 1 ve 1,2 mg/mL konsantrasyonlarıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucu HPLC’de görülen alan değerleriyle çalışılan konsantrasyon değerlerinin ilişkisinin doğrusal olduğu görülmüştür (Şekil 39 ve Şekil 40). Sonuçlara uygun olarak çizilen kalibrasyon eğrisinin determinasyon katsayısı (R²) allantoin ve lidokain HCl etken maddeleri için sırası ile 0,9997 ve 1,0000 olarak, kalibrasyon denklemleri de

$y = 1923654,3758x + 46657,6486$ ve $y = 7119557,6415x + 52027,7838$ olarak bulunmuştur.

Uygulama aralığı parametresi çalışılmış ve etken maddenin çalışma derişiminin % 70 ile % 120 aralığı, çalışma aralığı olarak uygun bulunmuştur.

HPLC validasyonu için yapılan doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmasında 0,7, 1,0 ve 1,3 mg/mL konsantrasyonlarıyla çalışılmıştır. Gerçekleştirilen doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmaları sonucu elde edilen değerlerle (Tablo 21-22) hesaplanan % geri elde edilebilirlik değerlerinin ortalaması, SS ve RSS değerleri geliştirilen analitik yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

HPLC validasyonu için yapılan kesinlik çalışması için kalibrasyon eğrisi çiziminde kullanılan konsantrasyonlardan 1 mg/mL ile gerçekleştirilmiştir. Kesinlik çalışması dahilinde tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik çalışmaları sonuçlarının %RSD değerleri 2’den küçük bulunmuştur (Tablo 23 ve Tablo 24). Elde edilen bu veriler analitik yöntemin allantoin-lidokain HCl miktar tayinini güvenilir biçimde yaptığını göstermektedir.

HPLC validasyonu için yapılan sağlamlık çalışmasında test ve standart çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar 25 °C’de allantoin ve lidokain HCl test çözeltilisinin 48 saat stabil olduğunu göstermektedir.

Etken maddelerin salım özelliklerinin değerlendirilmesi için yapılan çalışmada iki etken madde için de tüm skafoldlarda 1. saat sonunda %50'nin üzerinde sonuçlar elde edilirken 9 saat sonunda etken madde salımının %85'ten fazlası gerçekleşmiştir (Şekil 41-42). Bu veriler ışığında iki etken maddenin de skafoldlardan hızlıca salındığı söylenebilmektedir. Bu durum da yara acısının hemen giderilmesi ve yara

iyileşme sürecinin hızlıca başlaması bakımlarından olumlu bir tablo teşkil oluşturmaktadır (Tablo 25-26). Skafoldlardan hem allantoinin hem de lidokain HCl'in salım kinetikleri incelenmiştir. 0. derece, 1. derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Hickson-Crowell modellerine göre etken maddelerin salım özellikleri değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen R^2 değerleri Tablo 27'de sunulmuştur. En yüksek R^2 değeri Korsmeyer-Peppas modelinde bulunmuştur.

Etken madde yüklü skafoldlar üzerinde gerçekleştirilen optik mikroskop (Şekil 43) ve atomik kuvvet mikroskobu (Şekil 44-47) çalışmaları, etken madde içermeyen formülasyonlar için yapılan çalışma sonuçları ile örtüşmekte ve etken maddenin skafoldların topografik özelliklerine olumsuz bir etkisi olmadığı görülmektedir).

En yüksek miktarda kollajen ihtiva eden etken madde yüklenmiş F11-4 numaralı formülasyon ile 3 paralel ile $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ / %60 bağıl nem \pm %5 bağıl nem koşulunda 3 aylık stabilite çalışması yürütülmüştür (Tablo 27). Stabilite çalışması sonucunda tüm paralellerin %5'ten daha az değişim gösterdiği ve ICH gerekliliklerini karşıladıkları görülmüştür (ICH, Q1A(R2)). Ambalaj materyali kimyasal olarak aktif bir materyal olmayan alüminyum blister folyo olarak tasarlanan skafoldlar, stabilite kabinine de bu şekilde konulmuş olup, 3 ay sonunda görsel incelemede uygunsuz bir durumla karşılaşmamıştır.

Son aşamada etken madde yüklenmemiş F10-1, F10-2, F10-3, F10-4 numaralı formülasyonlar ve etken madde içeren F11-1, F11-2, F11-3, F11-4 numaralı formülasyonlar ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Etken madde yüklü olan ve olmayan tüm örneklerin sitotoksik etki göstermedikleri, başta doku mühendisliği ve rejeneratif tıp da dahil olmak üzere birçok alanda potansiyel olarak kullanımlarının uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 48).

Tüm yapılan çalışmalar ışığında, kitozan ve kollajen polimerlerinin yara iyileşmesi sürecine katkıları değerlendirildiğinde birbirlerini destekleyici özellikte oldukları görülmektedir. Allantoin yüklü kitozan-kollajen yapıda skafold çalışması bulunmaması, ilave olarak hasta uyuncunu olumlu etkileyebilecek Lidokain HCl formülasyona katkıları göz önünde bulundurulduğunda yapılan çalışmanın fark

yarattığı ve tasarlanan yara örtüsünün ticari preparatlara alternatif olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

5. KAYNAKÇA

Alam MJ, Ahmad S. FTIR, FT-Raman, UV-Visible spectra and quantum chemical calculations of allantoin molecule and its hydrogen bonded dimers. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2015;136(PB):961–978.

Alavarse AC, de Oliveira Silva FW, Colque JT, et al. Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibers mats based on PVA and chitosan for wound dressing. *Mater Sci Eng C.* 2017;77:271-281.

Albanna MZ, Holmes IV JH, Allen-Hoffmann BL, Rooney PJ. *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine.*; 2016.

Alemdaroğlu C, Değim Z, Çelebi N, Zor F, Öztürk S, Erdoğan D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns.* 2006;32:319–327.

Alpar O, Cevher E, Özsoy Y. Nanopartiküllerin Gen Tedavisinde Kullanılması. In: Gürsoy A, eds. *Nanofarmasötikler ve uygulamaları. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, İstanbul;* 2014, p:268.

Anjum S, Gupta A, Sharma D, vd. Development of novel wound care systems based on nanosilver nanohydrogels of polymethacrylic acid with Aloe vera and curcumin. *Mater Sci Eng C.* 2016;64:157–166.

Arakawa T, Maluf NK. The effects of allantoin, arginine and NaCl on thermal melting and aggregation of ribonuclease, bovine serum albumin and lysozyme. *Int J Biol Macromol.* 2018;107:1692–1696.

Araújo LU, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VCF, Carneiro CM, Silva-Barcellos NM. Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cir Bras.* 2010;25(5):460–461.

Badawi HM, Förner W, Ali SA. The molecular structure and vibrational, ¹H and ¹³C NMR spectra of lidocaine hydrochloride monohydrate. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2016;152:92–100.

Badıllı U, Tarımcı N. Dermokozmetik/Kozmesötik Etkin Maddeler-1. In: Yazan Y, eds. Dermokozmetik Kozmesötik Madde ve Ürünler. İstanbul; 2016, p:30.

Becerra J, Sudre G, Royaud I, vd. Tuning the Hydrophilic/Hydrophobic Balance to Control the Structure of Chitosan Films and Their Protein Release Behavior. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(4):1070–1083.

Birincioğlu M, Kayaalp SO. Antiaritmik İlaçlar. In: Kayaalp SO, eds. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1st ed. Ankara; 2009, p:427-428.

Boetang JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems : A Review. *J Pharm Sci*. 2008;97(8):2892–2923.

Boucard N, Viton C, Agay D, vd. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*. 2007;28(24):3478–3488.

Braga RR, Sales J, Marins RDCEE, Ortiz GMD, Garcia S. Development and validation of a method for allantoin determination in liposomes and pharmaceutical formulations. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2012;91:389–394.

Brown MA, Daya MR, Worley JA. Experience with Chitosan Dressings in a Civilian EMS System. *J Emerg Med*. 2009;37(1):1–7.

Caliari SR, Ramirez MA, Harley BAC. Biomaterials The development of collagen-GAG scaffold-membrane composites for tendon tissue engineering. *Biomaterials*. 2011;32(34):8990–8998.

Canelón SP, Wallace JM. β -Aminopropionitrile-induced reduction in enzymatic crosslinking causes in vitro changes in collagen morphology and molecular composition. *PLoS One*. 2016;11(11):1–13.

Cavatur R, Murti Vemuri N, Chrzan Z. Use of isothermal microcalorimetry in pharmaceutical preformulation studies part III. Evaluation of excipient compatibility of a new chemical entity. *J Therm Anal Calorim*. 2004;78(1):63-72.

Carvalho IC, Mansur HS. Engineered 3D-scaffolds of photocrosslinked chitosan-gelatin hydrogel hybrids for chronic wound dressings and regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2017;78:690–705.

Celleno L, Tamburi F. Structure and Function of the Skin. *Nutr Cosmet Beauty from Within*. 2009:3–45.

Cevc G. Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1996;13(3-4):257-388.

Chao S, Li Y, Zhao R, vd. Synthesis and characterization of tigeicycline-loaded sericin/poly(vinyl alcohol) composite fibers via electrospinning as antibacterial wound dressings. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018;44(November 2017):440–447.

Cubo N, Garcia M, del Canizo JF, Velasco D, Jorcano JL. 3D bioprinting of functional human skin: production and in vivo analysis. *Biofabrication*. 2016;9(1):015006.

da Silva CV, Pereira VJ, Costa GMN, vd. Supercritical solvent impregnation/deposition of spilanthol-enriched extracts into a commercial collagen/cellulose-based wound dressing. *J Supercrit Fluids*. 2018;133(August 2017):503–511.

da Silva DM, Martins JLR, de Oliveira DR, vd. Effect of allantoin on experimentally induced gastric ulcers: Pathways of gastroprotection. *Eur J Pharmacol*. 2018;821(November 2017):68–78.

Das B, Nayak AK, Nanda U. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: Preparation and in vitro skin permeation. *Int J Biol Macromol*. 2013;62:514–517.

Değim T. Deriden emilim ve deriye uygulanan yarı katı preparatlar. *Modern Farmasötik Teknoloji, Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Ankara*; 2007, p:338-364.

DeLaune S, Ladner PK, McTier L, Tollefson J, Lawrence J. Skin Integrity and Wound Healing. In: Fundamentals of Nursing. Australia: Sydney Cengage Learning; 2016, p:963

Dhivya S, Padma V, Santhini E. Wound dressings – a review Selvaraj. *BioMedicine*. 2015;5(4):24–28.

Doyle AD. HHS Public Access. *Curr Protoc Cell Biol*. 2017;72:1–22.

Durmus AS, Yaman M, Can HN. Effects of extractum cepae, heparin, allantoin gel and silver sulfadiazine on burn wound healing: An experimental study in a rat model. *Vet Med (Praha)*. 2012;57(6):287–292.

Eccleston GM. Wound dressings. In: Aulton ME, eds. *Pharmaceutics: The science of dosage form design*. 3rd edition. UK: Churchill Livingstone; 2007, p:264–271.

Ehrenreich M, Ruszczak Z. Update on Tissue-Engineered Biological Dressings. *Tissue Eng*. 2006;0(0):060913044658015.

Ehterami A, Salehi M, Farzamfar S, vd. In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model. *Int J Biol Macromol*. 2018;117:601–609.

European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 9th Edition Monographs / Lidocaine Hydrochloride; 2017

European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 9th Edition Monographs / Allantoin; 2017

Fan X, Chen K, He X, vd. Nano-TiO₂/collagen-chitosan porous scaffold for wound repairing. *Int J Biol Macromol*. 2016;91:15–22.

Alexandrovich FP, Anatolievich NV, Nikolaevich CY, Vitalievna BA, Ivanovich SA, Ilinichna PS. Preclinical study of the efficacy and safety of wound healing gel containing chitosan, taurine and allantoin. *Pharmacol Clin Pharmacol*. 2017;3(2):14–28.

Fernandes LL, Resende CX, Tavares DS, Soares GA, Castro LO, Granjeiro JM. Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering. *Polímeros*. 2011;21(1):1–6.

Fernández-de Castro L, Mengíbar M, Sánchez Á, vd. Films of chitosan and chitosan-oligosaccharide neutralized and thermally treated: Effects on its antibacterial and other activities. *LWT - Food Sci Technol*. 2016;73:368–374.

Florentino IF, Silva DPB, Galdino PM, vd. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Memora nodosa* and allantoin in mice. *J Ethnopharmacol*. 2016;186:298–304.

Forslind B, Lindberg M. *Skin, hair and nails structure and function*. New York; 2004.

Franz-Montan M, Baroni D, Brunetto G, vd. Liposomal lidocaine gel for topical use at the oral mucosa: Characterization, in vitro assays and in vivo anesthetic efficacy in humans. *J Liposome Res*. 2015;25(1):11–19.

Fu L, Xie J, Carlson MA, Reilly DA. Three-dimensional nanofiber scaffolds with arrayed holes for engineering skin tissue constructs. *MRS Commun*. 2017;7(3):361–366.

Gameil AHM, Hashim YZH, Salleh HM. Chitosan Microcarriers in Mammalian Cell Culture. 2014:41–44.

Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(12):1531–1546.

Gilaberte Y, Prieto-Torres L, Pastushenko I, Juarranz A. *Anatomy and Function of the Skin*. (Hamblin MR, Avci P, Prow T, ed.); 2016.

Goh MC, Hwang Y, Tae G. Epidermal growth factor loaded heparin-based hydrogel sheet for skin wound healing. *Carbohydr Polym*. 2016;147:251–260.

Gong JP. Why are double network hydrogels so tough? *Soft Matter*. 2010;6(12):2583.

Gonzalez AC de O, Costa TF, Andrade Z de A, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91(5):614–620.

Gorczyca G, Tylingo R, Szweda P, Augustin E, Sadowska M, Milewski S. Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO₂ solution. *Carbohydr Polym*. 2014;102(1):901–911.

Gordh T. Lidocaine: the origin of a modern local anesthetic. 1949. *Anesthesiology*. 2010;113(6):1433–1437.

Gordon S, DANeshian Ma, Bouwstra J, vd. t 4 Workshop Report * Non-Animal Models of Epithelial Barriers (Skin , Intestine and Lung) in Research , Industrial Applications and Regulatory Toxicology. *ALTEX*. 2015;32(4):327–378.

Grier WK, Tiffany AS, Ramsey MD, Harley BAC. Incorporating β -cyclodextrin into collagen scaffolds to sequester growth factors and modulate mesenchymal stem cell activity. *Acta Biomater*. 2018;76:116–125.

Harvell J, Bason M, Maibach HI. Contact urticaria and its mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 1994;32(2):103-112.

He Q, Ao Q, Gong Y, Zhang X. Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(12):2791–2802.

Humberto J, Llanos R, Cristina L, Vercik DO, Vercik A. Physical Properties of Chitosan Films Obtained after Neutralization of Polycation by Slow Drip Method
Physical Properties of Chitosan Films Obtained after Neutralization of Polycation by Slow Drip Method. 2015;(January).

ICH Q1AR2 Stability Testing of New Drug Substances and Products

ICH Q2R1 Validation of Analytical Procedures; Text and Methodology

Jaitley S, Saraswathi T. Pathophysiology of Langerhans cells. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(2):239.

Järbrink K, Ni G, Sönnergren H, vd. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. *Syst Rev*. 2017;6(1):15.

Jones AM, San Miguel L. Are modern wound dressing a clinical and cost-effective alternative to the use of gauze? *J Wound Care*. 2006;15(2):65–69.

Jones V, Grey J, Harding K. ABC of wound healing: Wound dressings. *Br Med J*. 2006;332(April):777–780.

Jull A, Mhurchu Ni C, Bennett D, Dunshea-mooij C, Rodgers A. Chitosan for overweight or obesity (Review). 2008;(3):3–5.

Kamoun EA, Kenawy ERS, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J Adv Res*. 2017;8(3):217–233.

Karagoz H, Yuksel F, Ulkur E, Evinc R. Comparison of efficacy of silicone gel, silicone gel sheeting, and topical onion extract including heparin and allantoin for the treatment of postburn hypertrophic scars. *Burns*. 2009;35(8):1097–1103.

Khor E. Chapter 6. Chitin and Chitosan Relative to Collagen and Hyaluronan. Elsevier Ltd; 2014.

Kim GG, Ku SK, Lee DW, vd. Effects of silicone-based gels containing allantoin, dexpanthenol and heparin on hypertrophic scarring in the rabbit ear model. *Drug Dev Res*. 2012;73(3):146–153.

Kishen A, Shrestha S, Shrestha A, Cheng C, Goh C. Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dent Mater*. 2016;32(8):968–977.

Koehler J, Brandl FP, Goepferich AM. Hydrogel wound dressing for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *Eur Polym J*. 2018;100(August 2017):1–11.

Kumar S, Wong PF, Leaper DJ. What is new in wound healing? *Turkish J Med Sci*. 2004;34(3):147–160.

- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.; 2014.
- Kurtoğlu AH, Karataş A. Yara tedavisinde güncel yaklaşımlar : Modern yara örtüleri. Ankara Ecz Fak Derg. 2009;38(3):211–232.
- Lawrence JC. Dressings and wound infection. Am J Surg. 1994;167(1 SUPPL.):21–24.
- Lee JM, Shin TJ. Use of local anesthetics for dental treatment during pregnancy; safety for parturient. J Dent Anesth Pain Med Copyright© J Dent Anesth Pain Med. 2017;17(2):81–90.
- Lee MY, Lee NH, Jung D, vd. Protective effects of allantoin against ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation in a murine model of asthma. Int Immunopharmacol. 2010;10(4):474–480.
- Lewandowska K, Sionkowska A, Grabska S. Chitosan blends containing hyaluronic acid and collagen. Compatibility behaviour. J Mol Liq. 2015;212:879–884.
- Liland KB, Hvidsten S. Determine the compatibility between electrical insulation fluids and solid materials using a micro-calorimeter. IEEE Trans Dielectr Electr Insul. 2016;23(2):901-907.
- Lin SY, Chen KS, Run-Chu L. Design and evaluation of drug-loaded wound dressing having thermoresponsive, adhesive, absorptive and easy peeling properties. Biomaterials. 2001;22(22):2999–3004.
- Lu Z, Gao J, He Q, vd. Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing. Carbohydr Polym. 2017;156:460–469.
- Madrazo-Jiménez M, Rodríguez-Caballero Á, Serrera-Figallo MÁ, vd. The effects of a topical gel containing chitosan, 0,2% chlorhexidine, allantoin and despanthenol on the wound healing process subsequent to impacted lower third molar extraction. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2016;21(6):e696–e702.

Maibach H. *Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects.*; 2014.

Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, William R. *Guideline for Prevention of Surgical Site Infection*, 1999. *AJIC*. 1999;97–134.

Martin P. *Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration*. *Science* (80-). 1997;276(5309):75–81.

Mauricio-Sánchez RA, Salazar R, Luna-Bárceñas JG, Mendoza-Galván A. FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning. *Vib Spectrosc*. 2018;94:1–6.

Maver T, Gradišnik L, Kurečič M, vd. Layering of different materials to achieve optimal conditions for treatment of painful wounds. *Int J Pharm*. 2017;529(1-2):576–588.

Menon GK. *New insights into skin structure: scratching the surface*. *Adv. Drug Del. Rev*. 2002;54(1):3-17.

Michalska-Sionkowska M, Walczak M, Sionkowska A. Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. *Polym Test*. 2017;63:360–366.

Mohseni M, Shamloo A, Aghababaei Z, Vossoughi M, Moravvej H. *Antimicrobial Wound Dressing Containing Silver Sulfadiazine With High Biocompatibility: In Vitro Study*. *Artif Organs*. 2016;40(8):765–773.

Monnier A, Al Tawil E, Nguyen QT, Valleton JM, Fatyeyeva K, Deschrevel B. *Functionalization of poly(lactic acid) scaffold surface by aminolysis and hyaluronan immobilization: How it affects mesenchymal stem cell proliferation*. *Eur Polym J*. 2018;107:202–217.

Muangman P. *Efficacy of the combination of herbal extracts and a silicone derivative in the treatment of hypertrophic scar formation after burn injury*. *African J Pharm Pharmacol*. 2011;5(3):442–446.

Murakami K, Aoki H, Nakamura S, vd. Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*. 2010;31(1):83–90.

Muwaffak Z, Goyanes A, Clark V, Basit AW, Hilton ST, Gaisford S. Patient-specific 3D scanned and 3D printed antimicrobial polycaprolactone wound dressings. *Int J Pharm*. 2017;527(1-2):161–170.

Naseri-Nosar M, Ziora ZM. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydr Polym*. 2018;189(November 2017):379–398.

Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;60(2):167–178.

Ng WL, Yeong WY, Naing MN. Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. *Int J Bioprinting*. 2016;2(1).

NICE. Oxyzyme and Iodozyme 2-layer hydrogel wound dressings with iodine for treating chronic wounds. 2014:1–36.

Niiyama H, Kuroyanagi Y. Development of novel wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge containing epidermal growth factor and vitamin C derivative. *J Artif Organs*. 2014;17(1):81–87.

Nishinami S, Yoshizawa S, Arakawa T, Shiraki K. Allantoin and hydantoin as new protein aggregation suppressors and their mechanisms of action. *Int J Biol Macromol*. 2018;114:497–503.

Niu X, Feng Q, Wang M, Guo X, Zheng Q. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. *J Control Release*. 2009;134(2):111-117.

Noh HK, Lee SW, Kim JM, vd. Electrospinning of chitin nanofibers: Degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomaterials*. 2006;27(21):3934–3944.

Noriega SE, Subramanian A. Consequences of Neutralization on the Proliferation and Cytoskeletal Organization of Chondrocytes on Chitosan-Based Matrices. *Int J Carbohydr Chem.* 2011;2011:1–13.

Ovsianikov A, Khademhosseini A, Mironov V. The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies. 2018;36(4):348–357.

Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol.* 2011;49(4):396–402.

Palantoken A, Sari Yilmaz M, Altikatoğlu Yapaöz M, Yenigül Tulunay E, Eren T, Piskin S. Dual antimicrobial effects induced by hydrogel incorporated with UV-curable quaternary ammonium polyethyleneimine and AgNO₃. *Mater Sci Eng C.* 2016;68:494–504.

Pan H, Jiang H, Chen W. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-co-glycolide. *Biomaterials.* 2006;27(17):3209–3220.

Pásztor N, Rédai E, Szabó Z-I, Sipos E. Preparation and Characterization of Levofloxacin-Loaded Nanofibers as Potential Wound Dressings. *Acta Medica Marisiensis.* 2017;63(2):66–69.

Paul W, Sharma C. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs.* 2004;18(1):18–23.

Queiroz MF, Melo KRT, Sabry DA, Sasaki GL, Rocha HAO. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? *Mar Drugs.* 2015;13(1):141–158.

Ramasamy P, Shanmugam A. Characterization and wound healing property of collagen-chitosan film from *Sepia kobeensis* (Hoyle, 1885). *Int J Biol Macromol.* 2015;74:93–102.

Ravindran S, Song Y, George A. Development of Three-Dimensional Biomimetic Scaffold to Study Epithelial – Mesenchymal Interactions. 2010;16(1).

Rees A, Powell LC, Chinga-Carrasco G, vd. 3D bioprinting of carboxymethylated-periodate oxidized nanocellulose constructs for wound dressing applications. *Biomed Res Int*. 2015;2015.

Rehder J, Martinhão Souto LR, Magro Issa CMB, Puzzi MB. Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. *Sao Paulo Med J*. 2004;122(1):22–25.

Rigo C, Ferroni L, Tocco I, vd. Active silver nanoparticles for wound healing. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):4817–4840.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006;31(7):603–632.

Rogers A, Jeschke M. Managing severe burn injuries : challenges and solutions in complex and chronic wound care. *Chronic Wound Care Manag Res*. 2016;3:59–71.

Romić MD, Klarić MŠ, Lovrić J, vd. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as in situ forming hydrogel: An innovative antimicrobial wound dressing. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;107:67–79.

Rubina MS, Kamitov EE, Zubavichus Y V., vd. Collagen-chitosan scaffold modified with Au and Ag nanoparticles: Synthesis and structure. *Appl Surf Sci*. 2016;366:365–371.

Sargeant TD, Desai AP, Banerjee S, Agawu A, Stopek JB. *Acta Biomaterialia* An in situ forming collagen – PEG hydrogel for tissue regeneration. *Acta Biomater*. 2012;8(1):124–132.

Schneider J, Biedermann T, Widmer D, vd. Matriderm® versus Integra®: A comparative experimental study. *Burns*. 2009;35(1):51–57.

Sen CK, Gordillo GM, Roy S, vd. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy: PERSPECTIVE ARTICLE. *Wound Repair Regen*. 2009;17(6):763–771.

Sezer AD. Fukoidan İçeren Farmasötik Şekillerin Yanık Tedavisinde Değerlendirilmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2006, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. J Akbuğa).

Shestopalov A V., Shkurat TP, Mikashinovich ZI, vd. Biological functions of allantoin. *Biol Bull.* 2006;33(5):437–440.

Shi H, Han C, Mao Z, Ma L, Gao C. Enhanced Angiogenesis in Porous Collagen–Chitosan Scaffolds Loaded with Angiogenin. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(11):1775–1785.

Shlivko IL, Kirillin MY, Donchenko E V., vd. Identification of layers in optical coherence tomography of skin: Comparative analysis of experimental and Monte Carlo simulated images. *Ski Res Technol.* 2015;21(4):419–425.

Silva M, Castro M. New Dressings, Including Tissue-Engineered Living Skin. *Clin Dermatol.* 2002;20:715–723.

Simões D, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P, Mendonça AG, Correia IJ. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;127(February):130–141.

Soni B, Hassan EB, Schilling MW, Mahmoud B. Transparent bionanocomposite films based on chitosan and TEMPO-oxidized cellulose nanofibers with enhanced mechanical and barrier properties. *Carbohydr Polym.* 2016;151:779–789.

Sponge C, Augments S, Ti D, vd. Controlled Release of Thymosin Beta 4 Using Cutaneous Wound Healing and Increases Angiogenesis. 2014;00(00):1–9.

Sripriya R, Kumar R. A Novel Enzymatic Method for Preparation and Characterization of Collagen Film from Swim Bladder of Fish Rohu (*Labeo rohita*). *Food Nutr Sci.* 2015;6(November):1468–1478.

Sun BK, Saprashvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science.* 2014;346(6212):941–945.

Şenel S, Nanotaşıyıcılarda Kullanılan Polimerler. In: Gürsoy A, eds. Nanofarmasötikler ve uygulamaları. Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, İstanbul; 2014, p:15.

Tanabe T, Okitsu N, Tachibana A, Yamauchi K. Preparation and characterization of keratin – chitosan composite film. *Biomaterials*. 2002;23(May 2001):817–825.

Taşar F, Kayaalp SO. Lokal Anestezikler. In: Kayaalp SO, eds. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1st ed. Ankara; 2009, p:690.

Tayebi L, Rasoulianboroujeni M, Cui Z, Ye H. 3D-printed thick structured gelatin membrane for engineering of heterogeneous tissues. *Mater Lett*. 2018;217:39–43.

Tayebi L, Rasoulianboroujeni M, Moharamzadeh K, Almela TKD, Cui Z, Ye H. 3D-printed membrane for guided tissue regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2017;84(August 2017):148–158.

Temiz C, Temiz P, Sayin M, Ucar K. Effect of cepea extract-heparin and allantoin mixture on epidural fibrosis in a rat hemilaminectomy model. *Turk Neurosurg*. 2009;19:387–392.

Thakur RA, Florek CA, Kohn J, Michniak BB. Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *Int J Pharm*. 2008;364(1):87–93.

Thangavel P, Kannan R, Ramachandran B, Moorthy G, Suguna L, Muthuvijayan V. Development of reduced graphene oxide (rGO)-isabgol nanocomposite dressings for enhanced vascularization and accelerated wound healing in normal and diabetic rats. *J Colloid Interface Sci*. 2018;517:251–264.

Ti D, Hao H, Xia L, vd. Controlled Release of Thymosin Beta 4 Using a Collagen–Chitosan Sponge Scaffold Augments Cutaneous Wound Healing and Increases Angiogenesis in Diabetic Rats with Hindlimb Ischemia. *Tissue Eng Part A*. 2014;21(3-4):541–549.

Tort S, Acartürk F, Be A. Evaluation of three-layered doxycycline-collagen loaded nano fi ber wound dressing. *Int J Pharm*. 2017;529:642–653.

Ungureanu C, Ioniță D, Berteanu E, Tcacenco L, Zuav A, Demetrescu I. Improving natural biopolymeric membranes based on chitosan and collagen for biomedical applications introducing silver. *J Braz Chem Soc.* 2015;26(3):458–465.

USP 40–NF 35 General Information /1046 Cellular and Tissue-Based Products; 2017.

USP 40–NF 35 Official Monographs / Allantoin; 2017.

USP 40–NF 35 Official Monographs / Chitosan; 2017.

USP<1225> Validation of Compendial Methods.

Üstünes L, Rx Media Pharma® İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı 2018

Veerasubramanian PK, Thangavel P, Kannan R, Chakraborty S, Ramachandran B, Suguna L, vd. An investigation of konjac glucomannan-keratin hydrogel scaffold loaded with *Avena sativa* extracts for diabetic wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2018;165:92–102.

Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, vd. Advances in skin regeneration using tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4).

Vijayavenkataraman S, Lu WF, Fuh JYH. 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. *Biofabrication.* 2016;8(3):032001.

Vinklárková L, Masteiková R, Foltýnová G, vd. Film wound dressing with local anesthetic based on insoluble carboxymethylcellulose matrix. *J Appl Biomed.* 2017;15(4):313–320.

Vowden K, Vowden P. *Wound dressings: principles and practice.* Surgery (Oxford), 2017;35(9), 489-494.

Wahyudi H, Reynolds AA, Li Y, Owen SC, Yu SM. Targeting collagen for diagnostic imaging and therapeutic delivery. *J Control Release.* 2016;240:323–331.

- Wang L, Wang W, Liao J, vd. Novel bilayer wound dressing composed of SIS membrane with SIS cryogel enhanced wound healing process. *Mater Sci Eng C*. 2018;85(November 2017):162–169.
- Wang Y, Qiao Y, Wang P, Li Q, Xia C, Ju M. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology Bio fabrication of silver nanoparticles as an effective wound healing agent in the wound care after anorectal surgery. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2018;178(67):457–462.
- Weinberg L. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lignocaine: A review. *World J Anesthesiol*. 2015;4(2):17.
- Wolff HH. Introduction to skin dermatology. In: Braun Falco's Dermatology, Burgdorf, W.H.C., Plewig, G., Landtdurumer, M., Wollf, H.H. (Eds.), Springer medizin verlag. 2009:5-16.
- Xie H, Chen X, Shen X, vd. Preparation of chitosan-collagen-alginate composite dressing and its promoting effects on wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2018;107(PartA):93–104.
- Yan M, Li B, Zhao X, vd. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chem*. 2008;107(4):1581–1586.
- Yarış E, Kalyoncu N, Kayaalp SO. Hemostatik İlaçlar ve Replasman için Kullanılan Hemostatik Kan Ürünleri. In: Kayaalp SO, eds. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 1st ed. Ankara; 2009, p:519-520.
- Yeo J, Lee K, Kim H, Oh H, Kim A, Kim S. The Effects of PVA/Chitosan/Fibroin(PCF)-Blended Spongy Sheets on Wound Healing in Rats. *Biol Pharm Bull*. 2000;23(10):1220-1223.
- Ylitalo R, Lehtinen S, Wuolijoki E, Ylitalo P, Lehtimäki T. Cholesterol-lowering Properties and Safety of Chitosan. *Arzneimittelforschung*. 2011;52(01):1–7.
- Yuan T, Zhang L, Li K, vd. Collagen hydrogel as an immunomodulatory scaffold in cartilage tissue engineering. 2013;(May):337–344.

Yun YE, Jung YJ, Choi YJ, Choi JS, Cho YW. Artificial skin models for animal-free testing. *J Pharm Investig.* 2018;48(2):215–223.

Zhou J, Yao D, Qian Z, vd. Bacteria-responsive intelligent wound dressing: Simultaneous In situ detection and inhibition of bacterial infection for accelerated wound healing. *Biomaterials.* 2018;161:11–23.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Gizem	Soyadı	Karaca
Doğum Yeri	Silivri	Doğum Tarihi	16.01.1990
Uyruğu	T.C.	Tel	05068021948
E-mail	gzemkaraca@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2013
Lise	Vefa Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Arge Uzmanı	Sanovel İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.	2015-devam
Mesul Müdür	Bursa Eczacılar Kooperatifi	2014-2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi
Almanca	Orta	Orta	Orta
İtalyanca	Orta	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
77.5/100 (2014)								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2014)	78,92072	78,58206	67,11819
ALES Puanı (2012)	82.64784	82.42611	69.43082

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

EK : Tez Çalışmasından Sunulan Poster Bildirisi, Gizem Karaca, Gökçen Yaşayan, 'Drug Releasing Collagen/Chitosan Composite Scaffolds for Wound Healing', European Federation of Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting- 2018, Atina, Yunanistan, s13.