



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**YARA İYİLEŞMESİNDE KULLANILMAK ÜZERE BİTKİSEL
VE DOĞAL KAYNAKLI ETKİN MADDE İÇEREN
NANOPARTİKÜL YÜKLÜ FİLM ŞEKLİNDE YARA ÖRTÜSÜ
FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ayşe Nur BÜKE

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Müge KILIÇARSLAN**

**ANKARA
2025**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YARA İYİLEŞMESİNDE KULLANILMAK ÜZERE BİTKİSEL
VE DOĞAL KAYNAKLI ETKİN MADDE İÇEREN
NANOPARTİKÜL YÜKLÜ FİLM ŞEKLİNDE YARA ÖRTÜSÜ
FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ayşe Nur BÜKE

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Müge KILIÇARSLAN

**Bu araştırma, TÜBİTAK 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme
Programı tarafından 121R076 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2025

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yara iyileşmesinde kullanılmak üzere bitkisel ve doğal kaynaklı etkin madde içeren nanopartikül yüklü film şeklinde yara örtüsü formülasyonlarının hazırlanması ve değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar kendime aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşe Nur BÜKE

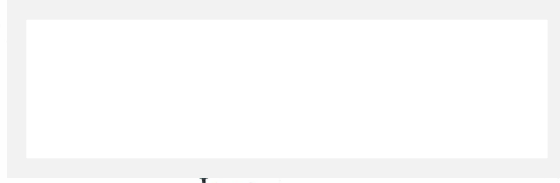
Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

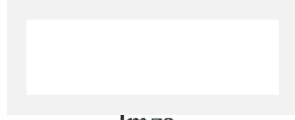
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
Ayşe Nur BÜKE tarafından hazırlanan
“Yara iyileşmesinde kullanılmak üzere bitkisel ve doğal kaynaklı etkin madde içeren
nanopartikül yüklü film şeklinde yara örtüsü formülasyonlarının hazırlanması ve
değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY
BİRLİĞİ/~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/07/2025



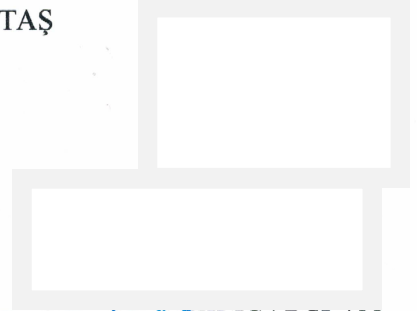
İmza

Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ
Ankara Üniversitesi
(Jüri Başkanı)

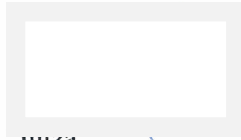


İmza

Doç. Dr. Serdar TORT
Gazi Üniversitesi
Raportör

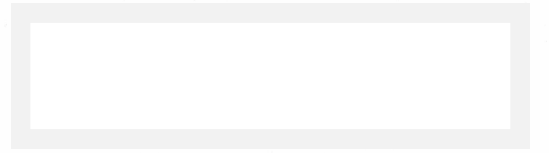


Prof. Dr. Müge KILIÇARSLAN
Ankara Üniversitesi
Üye (Danışman)



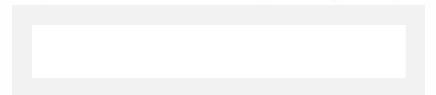
İmza

Prof. Dr. Fatma Nevin ÇELEBİ
Başkent Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. Çağdaş OTO
Ankara Üniversitesi
Üye

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



Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Yara İyileşmesinde Kullanılmak Üzere Bitkisel ve Doğal Kaynaklı Etkin Madde İçeren Nanopartikül Yüklü Film Şeklinde Yara Örtüsü Formülasyonlarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

Yara örtüleri, yara sebebiyle oluşan hasarlı bariyeri geçici olarak telafi etmek ve iyileşmeyi hızlandırmak için dışarıdan destekleyici olarak kullanılan, doku ile uyumlu materyallerdir. Yara bölgesini kurutmaya yönelik uzun yıllar süren yanlış yara bakımlarının ardından nemli ortam sayesinde yara dokusundaki epitelizasyonun hızlandığı tespit edilmiştir. Bu sebeple son yıllarda hidrofilik yapılı film formunda hazırlanmış yara örtüleri odak noktası haline gelmiştir. Yara tedavisinde tercih edilen tedavi yaklaşımlarından biri yara iyileştirici etkisi bilinen *Hypericum perforatum* (*H.perforatum*) gibi tıbbi bitkilerin kullanımınıdır. Bunun yanı sıra açık yaraların çoğunluğunda mikrobiyal kontaminasyon tespit edilmektedir ve iki yönlü tedavinin gerçekleştirilmesi için antimikrobiyal ilaç kullanımı da gerekmektedir. Borik asit ve sodyum pentaborat pentahidrat antiseptik ve antiviral aktivitelerinden dolayı çeşitli farmasötik formülasyonlarda aynı zamanda derin yara tedavilerinde kullanılan bor türevleridir. Bu avantajlar nedeniyle *H.perforatum* ve borik asitin bir yara örtüsünde birlikte kullanımı ile sinerjistik etki oluşturabilecek, yerel bir yara örtüsünün üç boyutlu (3B) olarak geliştirilebileceği hipotezi ile bu tez çalışması planlanmıştır.

Tez sürecinde *H.perforatum* içeren PCL nanopartikülleri ve borik asit içeren kitozan 3B film formülasyonları ayrı ayrı geliştirilip karakterizasyon çalışmaları yapılarak ve deneysel tasarım ile belirlenen optimize nanopartikül ve 3B film formülasyonlarının kombinasyonu ile *H.perforatum* yüklü nanopartikül ve borik asit içeren 3B basılmış kitozan yara örtüsü formülasyonu geliştirilmiştir. Formülasyonların karakterizasyonu için nanopartiküllerde zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve partikül büyüklük dağılımı, etkin madde yükleme etkinliği ve *in vitro* etkin madde salım çalışmaları yapılmıştır. Filmler ve nanopartikül yüklü yara örtüleri için kalınlık, şişme derecesi, etkin madde yükleme etkinliği ve *in vitro* etkin madde salım çalışmaları, gerilme direnci analizi, adezyon incelemeleri yapılmıştır. SEM ve Mikro-BT ile 3B yapıları analiz edilmiştir. Yara örtüsünün Mikro-BT analizleri ile diğer analizlerde tespit edemediğimiz katmanlı yapısı ve dokusu detaylı olarak incelenebilmiştir. Ayrıca antimikrobiyal aktivite ve hücre kültürü deneyleri ile sitotoksitesite ve scratch assay testleri gerçekleştirilmiştir. Ratlarda yara modeli oluşturularak yara örtüsünün *in vivo* etkisi incelenmiş ardından yapılan histopatolojik testler ve dokuda Mikro-BT ile yapılan analizler ile geliştirilen yara örtüsü formülasyonunun yara iyileştirme etkisi tespit edilmiştir. Tüm *in vitro* ve *in vivo* testler sonucunda nanopartiküle yükleme ile *H.perforatum* stabilitesi artırılmış, borik asitin hemen salımı ve hiperisinin uzun süre salımını sağlayan, adeziv, yeterli derecede şişerek dokuda destek sağlayabilen, yeterli direnç ve elastikiyette yara örtüsü elde edilebilmiştir. Histopatoloji ve Mikro-BT sonuçlarına göre *H.perforatum*'un tek başına veya borik asit ile birlikte kullanımının, yara iyileşmesinde enflamasyonu azaltarak fibroblast aktivitesini artırdığı, epitelizasyonu hızlandırdığı ve damarlanmayı destekleyerek 7 günde %70'ten fazla iyileşme tespit edilmiştir. Sonuç olarak tezde hedeflendiği şekilde yara tedavisinde tek ilaç şekli ile kombine tedavi sağlayabilecek ve böylece acı vermeden kolayca uygulanabilecek, tedavi sürecinde boyutu değişen yaraya uygun boyutta hastaya özel olarak hazırlanabilen, ülkemiz doğal kaynaklarının kullanımını sağlayan, 3B basılmış modern yara örtüsü hazırlanmış ve yerel ilaç şekli olarak üretime kazandırılmaya hazır hale getirilmiştir.

Anahtar sözcükler: 3B baskı, Bor, Borik asit, Doku rejenerasyonu, Film, Hidrojel, Hiperisin, *Hypericum perforatum*, Mikrobilgisayarlı tomografi, Nanopartikül, Yara iyileşmesi, Yara örtüsü

SUMMARY

Preparation and Evaluation of Nanoparticles Loaded Wound Dressing Formulations as Film Including Herbal and Natural Drugs to Be Used in Wound Healing

Wound dressings are biocompatible materials applied externally to temporarily compensate for the damaged barrier caused by the wound and to accelerate healing. After many years of incorrect wound care focused on drying the wound area, it has been determined that epithelialisation is accelerated in the moist environment. Therefore, recently, wound dressings prepared in the form of hydrophilic films have become the focus. One of the preferred treatment approaches in wound treatment is the use of medicinal plants such as *Hypericum perforatum* (*H.perforatum*), which is known for its wound healing effect. In addition, microbial contamination is frequently observed in open wounds and the use of antimicrobial agents is also necessary to enable dual-function therapy. Boric acid and sodium pentaborate pentahydrate, derivatives of boron, are used in various pharmaceutical formulations and in the treatment of deep wounds due to their antiseptic and antiviral activities. Based on these advantages, this thesis was planned with the hypothesis that a local wound dressing could be developed in three dimensions (3D) with the synergistic effect of using *H.perforatum* and boric acid together in a wound dressing. During the thesis process, PCL nanoparticles containing *H.perforatum* and chitosan 3D film formulations containing boric acid were developed separately, and characterization studies were performed, and a 3D printed chitosan wound dressing formulation containing *H.perforatum*-loaded nanoparticles and boric acid was developed with the combination of optimised nanoparticle and 3D film formulations determined by experimental design. For the characterization of the formulations, zeta potential, particle size and particle size distribution, drug loading efficiency and *in vitro* drug delivery studies were conducted in nanoparticles. Thickness, swelling degree, drug loading efficiency and *in vitro* drug delivery studies, tensile strength analysis, and adhesion studies were conducted for films and nanoparticle-loaded wound dressings. 3D structures were analysed with SEM and Micro-CT. With the Micro-CT analyses of the wound dressing, the layered structure and texture that could not be detected in other analyses could be examined in detail. In addition, antimicrobial activity and cell culture experiments were performed with cytotoxicity and scratch assay tests. The *in vivo* effect of the wound dressing was examined by creating a wound model in rats, and then the wound healing effect of the developed wound dressing formulation was determined with histopathological tests and tissue analyses by Micro-CT. As a result of all *in vitro* and *in vivo* tests, the stability of *H.perforatum* was increased by loading it with the nanoparticle, and a wound dressing that provided immediate release of boric acid and sustained release of hypericin was adhesive, could provide support in the tissue by sufficient swelling, and had sufficient strength and elasticity could be obtained. According to the histopathology and Micro-CT results, it was determined that the use of *H.perforatum* alone or together with boric acid reduced inflammation in wound healing, increased fibroblast activity, accelerated epithelialisation and supported vascularisation, and obtained wound healing more than 70% recovery in 7 days. As a result, a 3D printed modern wound dressing that can provide combined treatment with a single dosage form in wound treatment as targeted in the thesis and thus can be easily applied without causing pain, can be prepared specifically for the patient in a size appropriate for the wound that changes in size during the treatment process, and enables the use of our country's natural resources has been prepared and made ready to be put into production as a local dosage form.

Keywords: 3D printing, boric acid, boron, film, *Hypericum perforatum*, hypericin, hydrogel, microcomputed tomography, nanoparticle, tissue regeneration, wound dressing, wound healing

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	xi
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Deri Dokusu ve Deri Dejenerasyonu: Yara	2
1.1.1. Yara İyileşme Süreci	4
1.2. Yara Bakımı	6
1.3. Yara Örtüsü	7
1.3.1. Geleneksel Yara Örtüleri	9
1.3.2. Modern Yara Örtüleri	10
1.4. Yara Tedavisinde Tercih Edilen Tedavi Yaklaşımları	11
1.4.1. Tıbbi Bitkiler ve Yara Tedavisi	12
1.4.2. Antimikrobiyal Madde ve Yara Tedavisi	15
1.5. Yara Örtüsü Olarak Kullanılan Taşıyıcı Sistem ve Formülasyonlar	17
1.5.1. Filmler ve Hidrojeller	17
1.5.1.1. Çözücü Dökme Yöntemi	19
1.5.1.2. Üç Boyutlu (3B) Baskı Teknolojileri	20
1.5.2. Partiküler Sistemler	27
1.5.3. Kombine Sistemler	31
1.6. Tez Çalışmasında Film ve Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması için Kullanılan Polimerlerle İlgili Genel Bilgiler	32
1.6.1. Film Formülasyonlarında Kullanılan Polimer: Kitozan	32
1.6.2. Nanopartikül Formülasyonlarında Kullanılan Polimer: Polikaprolakton	35
1.7. Çalışmada Kullanılan Etkin Maddelerle İlgili Genel Bilgiler	36
1.7.1. <i>Hypericum perforatum</i>	36
1.7.2. Bor Türevleri	43
1.8. Deney Tasarımı (DoE) ve Farmasötik Ürün Geliştirme Sürecindeki Rolü	45
2. GEREÇ ve YÖNTEM	52
2.1. Gereçler	52
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	52
2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	53
2.2. Yöntemler	54
2.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar	54
2.2.2. <i>H.perforatum</i> 'un Standardının Çeşitli Çözünme Ortamlarındaki Analizleri	55
2.2.2.1. <i>H.perforatum</i> 'un Standardının UV-Vis Spektrofotometre ile Miktar Tayini ve Metanol Çözeltilisinde Kalibrasyonu	55
2.2.2.2. <i>H.perforatum</i> 'un Standardının HPLC Yöntemi ile Analiz Metodunun Geliştirilmesi	55
2.2.2.3. <i>H.perforatum</i> 'un Standardının HPLC Yöntemi ile <i>In Vitro</i> Çözünme Ortamında ve Metanol Çözeltilisinde Miktar Tayini ve Kalibrasyonu	56
2.2.3. Borik Asit'in UV-Vis Spektrofotometre ile Miktar Tayini	56
2.2.3.1. Borik Asit'in <i>In Vitro</i> Çözünme Ortamında ve %1,5 (h/h) Sulu Asetik Asit Çözeltilisinde UV-Vis Spektrofotometrik Yöntem ile Kalibrasyonu	57
2.2.4. Etkin Maddelerin Miktar Tayininde Kullanılan Analitik Yöntemlerin Validasyonu	57
2.2.4.1. Doğruluk	57
2.2.4.2. Kesinlik	58

2.2.4.3. Teşhis Sınırı (DL) ve Tayin Sınırı (QL)	59
2.2.4.4. Doğrusallık	60
2.2.4.5. Seçicilik	61
2.2.5. <i>H.perforatum</i> 'un Alkollü Ekstresinin Hazırlanması	61
2.2.6. <i>H.perforatum</i> 'un Alkollü Ekstresinin Farmakope Standartlarına Uygunluğunun Değerlendirilmesi	63
2.2.6.1. <i>H.perforatum</i> 'un Alkollü Ekstresinden UV-Vis Spektrofotometre ile Total Hiperisin Tayini	63
2.2.6.2. <i>H.perforatum</i> 'un Alkollü Ekstresinden HPLC Yöntemi ile Hiperisin Tayini	63
2.2.7. <i>H.perforatum</i> 'un Alkollü Ekstresinin Farklı Çözünme Ortamlarında Çözünürlük Çalışması	64
2.2.8. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	64
2.2.8.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması	65
2.2.8.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	68
2.2.8.2.1. Ortalama Nanopartikül Büyüklüğü, Partikül Büyüklüğü Dağılımları ve Zeta Potansiyellerinin İncelenmesi	68
2.2.8.2.2. Nanopartiküllerde Etkin Madde Yükleme Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi	69
2.2.8.2.3. Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin DSC ile İncelenmesi	69
2.2.8.2.4. Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin FTIR ile İncelenmesi	69
2.2.8.2.5. Nanopartiküllerde Işık Stabilitésinin Tayini	70
2.2.8.2.6. Etkin Maddenin Nanopartiküllerden <i>In vitro</i> Salımı	70
2.2.8.3. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun DoE ile Belirlenmesi	70
2.2.9. Film Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	72
2.2.9.1. Çözücü Dökme Yöntemiyle Hazırlanan Borik Asit Yüklü Film Formülasyonları	72
2.2.9.2. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Film Formülasyonlarının Hazırlanması	74
2.2.9.3. 3B Basılmış Film Formülasyonlarının Karakterizasyonu	78
2.2.9.3.1. 3B Basılmış Filmlerde Kalınlık ve Viskozite Tayini	78
2.2.9.3.2. 3B Basılmış Filmlerde Etkin Madde Yükleme Etkinliği	79
2.2.9.3.3. 3B Basılmış Filmlerde Adeziv Özelliklerinin İncelenmesi	79
2.2.9.3.4. 3B Basılmış Filmlerde Gerilme Direnci, Elastikiyet ve Young's Modül Tayini	79
2.2.9.3.5. 3B Basılmış Filmlerde Şişme Derecelerinin Tayini	80
2.2.9.3.6. 3B Basılmış Filmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Morfolojik İncelemeleri	80
2.2.9.3.7. 3B Basılmış Filmlerin 3B Mikroyapısının Görüntülenmesi	80
2.2.9.3.8. 3B Basılmış Film Formülasyonlarında Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin DSC ile İncelenmesi	82
2.2.9.3.9. 3B Basılmış Film Formülasyonlarında Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin FTIR ile İncelenmesi	82
2.2.9.3.10. 3B Basılmış Filmlerde <i>In Vitro</i> Etkin Madde Salımı	82
2.2.9.4. Optimum Film Formülasyonunun DoE ile Belirlenmesi	82
2.2.10. Nanopartikül Yüklü Yara Örtüsü Formülasyonlarının 3B Baskı Hazırlanması ve Karakterizasyonu	84
2.2.10.1. 3B Basılmış Yara Örtülerinde Su buharı Geçirgenliği Tayini	85
2.2.10.2. 3B Basılmış Yara Örtülerinde Oksijen Geçirgenliği Tayini	85
2.2.10.3. 3B Basılmış Yara Örtülerinde Stabilité Testleri	86
2.2.11. Hazırlanan Formülasyonların Antimikrobiyal Aktivite Analizleri	86
2.2.12. Hazırlanan Formülasyonların Hücre Kültürü Deneyleri ile Karşılaştırmalı Olarak <i>In Vitro</i> İncelenmesi	86
2.2.12.1. Sterilizasyon	86
2.2.12.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	87
2.2.12.3. <i>In Vitro</i> Yara İyileşmesi Deneyleri (Scratch Assay)	88
2.2.13. Hazırlanan Formülasyonların Tedavideki Etki Gücünün <i>In Vivo</i> Değerlendirilmesi	89
2.2.13.1. <i>In vivo</i> Çalışmadan Elde Edilen Deri Örneklerinde Mikro-BT İncelemeleri	91
2.2.13.2. <i>In vivo</i> Çalışmadan Elde Edilen Deri Örneklerinde Histopatolojik İncelemeler	93
3. BULGULAR	94
3.1. <i>H.perforatum</i> 'un Standardı ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	94
3.1.1. <i>H.perforatum</i> 'un Standardının UV-Vis Spektrumu	94

3.1.2. <i>H.perforatum</i> 'un Standardının HPLC Kromatogramı	95
3.2. Borik Asit ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	99
3.2.1. Borik Asitin UV-Vis Spektrumu	99
3.3. Etkin maddelerin HPLC Yöntemi ve UV-Vis Spektrofotometre Yöntemi ile Miktar Tayininin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular	100
3.3.1. Doğruluk	100
3.3.2. Kesinlik	103
3.3.3. Teşhis Sınırı (DL) ve Tayin Sınırı (QL)	109
3.3.4. Doğrusallık	110
3.3.5. Seçicilik	113
3.4. <i>H.perforatum</i> 'un Alkollü Ekstresinin Farmakope Standartlarına Uygunluğunun Değerlendirilmesine Ait Bulgular	114
3.4.1. <i>H.perforatum</i> 'un Alkollü Ekstresinden UV-Vis Spektrofotometre ile Total Hiperisin Tayini	114
3.4.2. <i>H.perforatum</i> 'un Alkollü Ekstresinden HPLC ile Hiperisin Tayini	114
3.5. <i>H.perforatum</i> 'un Alkollü Ekstresinin Farklı Çözünme Ortamlarında Çözünürlük Çalışmasına Ait Bulgular	115
3.6. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular	115
3.6.1. Nanopartikül Formülasyonlarında Ortalama Partikül Büyüklüğü, Partikül Büyüklüğü Dağılımları, Zeta Potansiyel, Etkin Madde Yükleme Etkinliği ve Etkin Madde Yükleme Kapasitesi Bulguları	115
3.6.1.1. Etkin Maddenin Nanopartiküllerden <i>In Vitro</i> Salımına Ait Bulgular	119
3.6.1.2. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun DoE ile Belirlenmesine Ait Bulgular	123
3.7. Film Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular	135
3.7.1. Çözücü Dökme Yöntemi ile Hazırlanan Borik Asit Yüklü Film Formülasyonlarının Geliştirilmesine Ait Bulgular	135
3.7.1.1. Çözücü Dökme Yöntemi ile Hazırlanan Borik Asit Yüklü Filmlerde Kalınlık ve Viskozite Tayinine Ait Bulgular	135
3.7.2. 3B Baskı ile Hazırlanan Borik Asit Yüklü Film Formülasyonlarının Baskı Parametrelerine Belirlenmesi İçin Yapılan Ön Çalışmalara Ait Bulguları	136
3.7.3. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Film Formülasyonlarının Hazırlanmasına Ait Bulgular	137
3.7.3.1. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Filmlerde Kalınlık, Viskozite ve Etkin Madde Yükleme Etkinliği Tayinine Ait Bulgular	137
3.7.3.2. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Filmlerde Gerilme Direnci ve Adezyon Testlerine Ait Bulgular	139
3.7.3.3. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Filmlerde Şişme Derecelerine Ait Bulgular	140
3.7.3.4. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Filmlerde <i>In Vitro</i> Etkin Madde Salımına Ait Bulgular	143
3.7.4. Optimum Film Formülasyonunun DoE ile Belirlenmesine Ait Bulgular	144
3.8. Nanopartikül Yüklü Yara Örtüsü Formülasyonlarına Ait Bulgular	157
3.9. Antimikrobiyal Aktivite Analizlerine Ait Bulgular	164
3.10. Hücre Kültürü Deneylerine Ait Bulgular	164
3.11. Hazırlanan Formülasyonların Tedavideki Etki Gücünün <i>In Vivo</i> Değerlendirilmesine Ait Bulgular	170
4. TARTIŞMA	179
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	227
KAYNAKLAR	229
EKLER	257
Ek 1. Hayvan Deneyi Yerel Etik Kurul Kararı	257
Ek 2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	259
ÖZGEÇMİŞ	261

ÖNSÖZ

Yara örtüleri, yara sebebiyle oluşan hasarlı bariyeri geçici olarak telafi etmek ve iyileşmeyi hızlandırmak için dışarıdan destekleyici olarak kullanılan, doku ile uyumlu materyallerdir. Yara bölgesini kurutmaya yönelik uzun yıllar süren yanlış yara bakımlarının ardından nemli ortam sayesinde yara dokusundaki epitelizasyonun hızlandığı tespit edilmiştir. Bu sebeple son yıllarda hidrofilik yapılı film formunda hazırlanmış yara örtüleri odak noktası haline gelmiştir. Yara tedavisinde tercih edilen tedavi yaklaşımlarından biri yara iyileştirici etkisi bilinen *Hypericum perforatum* (*H.perforatum*) gibi tıbbi bitkilerin kullanımıdır. Bunun yanı sıra açık yaraların çoğunluğunda mikrobiyal kontaminasyon tespit edilmektedir ve iki yönlü tedavinin gerçekleştirilmesi için antimikrobiyal ilaç kullanımı da gerekmektedir. Borik asit antiseptik ve antiviral aktivitelerinden dolayı çeşitli farmasötik formülasyonlarda aynı zamanda derin yara tedavilerinde kullanılan bor türevleridir. Bu avantajlar nedeniyle *H.perforatum* ve borik asitin bir yara örtüsünde birlikte kullanımı ile sinerjistik etki oluşturabilecek, yerel bir yara örtüsünün üç boyutlu (3B) olarak geliştirilebileceği hipotezi ile bu tez çalışması planlanmıştır.

Bu çalışmada yara iyileşmesinde kullanılmak üzere bitkisel ve doğal kaynaklı etkin madde olarak *Hypericum perforatum* ve bor içeren nanopartikül yüklü film şeklinde yara örtüsü formülasyonları geliştirilmiş ve *in vitro-in vivo* olarak değerlendirilmiştir. Formülasyon geliştirme çalışmalarının tamamı Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında, hücre kültürüne ait deneysel çalışmalar Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Araştırma Laboratuvarında, Mikro-BT analizleri Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarında ve *in vivo* çalışmalar ise Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Lisans ve lisansüstü öğrenimim boyunca değerli bilgileri, akademik deneyimleri ve çalışma disipliniyle bana her zaman örnek olan; bitmek bilmeyen ilgisi ve desteğiyle her an yanımda olduğunu hissettiren; birlikte çalışmaktan büyük bir onur duyduğum danışman hocam sayın Prof. Dr. Müge KILIÇARSLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Katkılarından dolayı başta tez izleme komitesinde yer alan saygıdeğer hocalarım sayın Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ, sayın Prof. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER ve Doç. Dr. Serdar

TORT'a, tez çalışmalarında ve doktora eğitimimde ziyadesiyle ilgi ve emeği bulunan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü'nün saygıdeğer öğretim üyelerine teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Deneyisel çalışmalarında bana yardımcı olan ve önemli katkılar sağlayan sayın Prof. Dr. Çağdaş OTO ve tüm ekibine, Mikro-BT ile 3B görüntü analizlerinde bana her türlü desteği sağlayan ve sabrı gösteren başta sayın Prof. Dr. Kaan ORHAN olmak üzere, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Mehmet Ali KILIÇARSLAN'a, sayın Dr. Öğr. Üyesi Arda BÜYÜKSUNGUR'a, ayrıca tüm 3B baskı öğrenme süreci ve hücre kültürü deneylerinde bana önemli katkılar sağlayan sayın Prof. Dr. Pınar Huri YILGÖR'e ve ekibine, bitki tanımlanması ve ekstraksiyonu işlemlerinde yardımlarından dolayı sayın Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her anlamda gösterdikleri ilgi ve destekten dolayı sayın hocalarım Doç. Dr. Özge İNAL, Doç. Dr. Umut Can ÖZ, Doç. Dr. Üyesi Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN, Dr. Öğr. Üyesi Miray İLHAN, Dr. Öğr. Üyesi Özge EŞİM, Dr. Öğr. Üyesi Aslıhan Hilal ALGAN, Ecz. Mert SERİM ve çalışma arkadaşlarım Ecz. Ömer YEDİKAYA, Ecz. Semra DURAK, Ecz. Büşra GELMEZ YILDIZ, Ecz. Hatice DEMİRTAŞ, Ecz. Cenk YILDIZ, Ecz. Fatih DELİCE, Ecz. Ayşenur BEZELYA, Ecz. Özlem NEKÜK, Ecz. Dicle DENİZHAN'a teşekkür ederim. Ayrıca, her daim yanımda olan kıymetli dostum Yeliz ESKİ'ye ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın tüm lisansüstü öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca bana verdikleri sonsuz sevgi ve güvenle her zaman güç kaynağım olan, en büyük manevi destekçim olan aileme; annem ve babam Zehra BÜKE ve Fahri BÜKE'ye, kardeşlerim Safiye BÜKE, Fatma Nur BÜKE ve Abdurrahim BÜKE'ye, sevgili amcam ve yengem Ayhan BÜKE ve Zeynep BÜKE ile kuzenlerime, manevi desteklerini esirgemeyen babaannem ve dedem Hacer BÜKE ve Necati BÜKE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu tez çalışmasını 121R076 nolu TÜBİTAK-1001 projesi ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%EE	% Enkapsülasyon Etkinliği
%LC	% İlaç Yükleme Kapasitesi
°C	Santigrat Derece
2FI	Two-Factor Interaction (İki Faktörlü Etkileşim)
3B	Üç Boyutlu
AÇEM	% Açığa Çıkan Etkin Madde Miktarı
Ag-ZnO	Gümüş-Çinko oksit
ATCC	American Type Culture Collection
BBD	Box-Behnken Design
BSS	Bağıl Standart Sapma
CAD	Computer-Aided Design (Bilgisayar Destekli Tasarım)
CCD	Central Composite Design (Merkezi Kompozit Tasarım)
CMC	Carboxymethyl Cellulose (Karboksimetil Selüloz)
dk	Dakika
DA	Degree of Anisotropy (Anizotropi Derecesi)
DL	Detection Limit (Teşhis Sınırı)
DLS	Dynamic Light Scattering (Dinamik Işık Saçılımı)
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagles Medium
DoE	Design of Experiment (Deneysel Tasarım)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extracellular Matrix (Hücre Dışı Matris)
EMA	European Medicines Agency (Avrupa İlaç Kurumu)
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FDM	Fused Deposition Modelling (Eriyik Yığılma Modelleme)
<i>H.perforatum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>
HEC	Hydroxyethyl Cellulose (Hidroksietil Selüloz)
HPLC	High-performance liquid chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
HPMC	Committee on Herbal Medicinal Products (Bitkisel Tıp Ürünleri Komitesi)
IJP	Inkjet Printing (Mürekkep Püskürtme Esaslı Baskı)
MA	Molekül Ağırlığı
mg	Miligram
Mikro-BT	Mikrobilgisayarlı Tomografi
ml	Mililitre
mm	Milimetre

MW	Molecular Weight
N	Newton
NIH	National Institutes of Health (Ulusal Sağlık Enstitüsü)
nm	Nanometre
Obj.V	Object Volume (Nesne Hacmi)
Obj.V/TV (%)	Object Volume/Total Volume% (%Nesne Hacminin Toplam Hacme Oranı)
PAM	Pressure-Assisted Microsyringe (Basınç Destekli Mikroşırınga)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)
PCL	Polycaprolactone (Polikaprolakton)
PDI	Polidispersite İndeksi
PLA	Poli laktik asit
PLGA	poli laktik-ko-glikolik asit
PMMA	Polimetil metakrilat
PTFE	Politetrafloroetilen
PVA	Polivinil alkol
QL	Quantification Limit (Tayin Sınırı)
r^2	Determinasyon Katsayısı
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
rpm	Rotations Per Minute (Dakika Başına Rotasyon)
RSM	Response Surface Methodology (Yanıt Yüzeyi Grafikleri)
S	Kalibrasyon Doğrusunun Eğimi
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SLA	Stereolitografi
SLS	Selective Laser Sintering (Seçici Lazer Sinterleme)
SS	Standart Sapma
SSE	Semi Solid Extrusion (Yarı Katı Ekstrüzyon)
TGF- β	Transforming Growth Factor-Beta (Dönüşüm Büyüme Faktörü Beta)
TV	Total Volume
UV-Vis	Ultra-Violet Visible (Ultraviyole-Görünür Bölge)
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
σ	Regresyon doğrularının standart sapması

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Derinin anatomik yapısı ve katmanları	3
Şekil 1.2. Yara iyileşme aşamalarının şematik gösterimi	5
Şekil 1.3. Laboratuvar koşullarında (A) ve daha büyük ölçeklerde (B, C) çözücü dökme yöntemiyle polimerik film hazırlanışının şematik gösterimi	20
Şekil 1.4. Eczacılık alanında kullanılan 3B baskı teknolojilerinin şematik gösterimi; A) İsteğe bağlı-damlacık B) Sürekli mürekkep püskürtmeli inkjet, C) SLA, D) SLS, E) SSE, F) FDM	22
Şekil 1.5. SSE 3B baskı tekniğinin şematik gösterimi, ekstrüzyon işlemiyle ilgili kritik parametreler (ekstrüzyon mekanizmaları, parametreler, nozül türü ve çapı) ve hammadde türleri	23
Şekil 1.6. Nanoçöktürme yöntemiyle nano ve mikropartikül üretim yönteminin şematik gösterimi	28
Şekil 1.7. Kitin ve kitozanın kimyasal yapısı	33
Şekil 1.8. <i>Hypericum perforatum</i> bileşenleri ve topikal etkileri	38
Şekil 1.9. Proseslerin veya sistemlerin kara kutu olarak şematik gösterimi (A) ve nihai çıktıdaki faktörlerin farklı etkileri (B)	46
Şekil 1.10. İki nicel deneysel faktör tarafından tanımlanan iki boyutlu deneysel alanın (A), Deneme yanılma deneysel yaklaşımının (B), kapsamlı taramanın (C) ve deney tasarımı (D) şematik gösterimi	47
Şekil 1.11. Yanıt yüzey tasarımlarının görselleştirilmiş örnekleri. (A) Tam Faktöriyel Tasarım, (B) Merkezi Bileşik Tasarım (CCD), (C) Box-Behnken Tasarımı (BBD), (D) Optimal Tasarım ve (E) Karışım Tasarımı	48
Şekil 2.1. <i>Hypericum perforatum</i> bitkisinin kurutma ve öğütme aşamaları	62
Şekil 2.2. Alkollü bitki ekstresinin hazırlama aşamaları	63
Şekil 2.3. Deney hayvanlarında cerrahi yaranın oluşturulması (A) ve formülasyonun yaraya uygulanması (B,C)	91
Şekil 3.1. Total hiperisin'in metanol ortamındaki UV-Vis spektrumu	94
Şekil 3.2. Total hiperisin'in metanol ortamında UV spektrofotometre yöntemiyle belirlenen kalibrasyon grafiği ve denklemi	94
Şekil 3.3. Hiperisin standardının metanol ortamında HPLC kromatogramı ve spektrumu	95
Şekil 3.4. Psödohiperisin standardının metanol ortamında HPLC kromatogramı ve spektrumu	95
Şekil 3.5. Metanol ortamındaki hiperisin standardının artan konsantrasyonlarına ait HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogramları	96
Şekil 3.6. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi	96
Şekil 3.7. Metanol ortamındaki psödohiperisin standardının artan konsantrasyonlarına ait HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogramları	97

Şekil 3.8. Psödohiperisin standardının HPLC ile metanol ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi	97
Şekil 3.9. Hiperisin standardının PBS içerisindeki HPLC kromatogramı ve spektrumu	98
Şekil 3.10. PBS ortamında hiperisin standardının artan konsantrasyonlarda HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogramları	98
Şekil 3.11. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle PBS ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi	99
Şekil 3.12. Borik asitin %1,5 (h/h) sulu asetik asit ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi	99
Şekil 3.13. Borik asitin PBS ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi	100
Şekil 3.14. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği	110
Şekil 3.15. Psödohiperisin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği	111
Şekil 3.16. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle PBS ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği	111
Şekil 3.17. Hiperisin standardının metanol ortamındaki UV spektrofotometre yöntemiyle %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği	112
Şekil 3.18. Borik asitin %1,5 (h/h) asetik asit ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği	112
Şekil 3.19. Borik asitin PBS ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği	113
Şekil 3.20. Farmakope yöntemiyle analiz edilen alkollü ekstre (A) ve psödohiperisin standardı ilave edilmiş ekstre (B) ve hiperisin standardı ilave edilmiş ekstre (C) kromatogramları	114
Şekil 3.21. Çeşitli çözücü ortamlardaki hiperisin çözünürlüğü ($n=3$): A) 25 µg hiperisine eşdeğer liyofilize bitki ekstresi, B) 50 µg hiperisine eşdeğer liyofilize bitki ekstresi (PBS (pH 7,4) ortamı (■); %0,2 h/h Tween 80 içeren PBS ortamı (✕); %25 h/h metanol içeren PBS ortamı (▲); %25 h/h etanol içeren PBS ortamı (●))($n=3$)	115
Şekil 3.22. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü dağılımları	117
Şekil 3.23. Farklı karıştırma hızı (ÖN1-ÖN5) ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı ($n=3$)	119
Şekil 3.24. Farklı PVA konsantrasyonu (ÖN3, ÖN6-7) ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı ($n=3$)	119
Şekil 3.25. Orta (ÖN8) ve yüksek karıştırma hızı (ÖN9) sabit tutulurken ek karıştırma olarak prob sonikasyon uygulaması ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı ($n=3$)	120
Şekil 3.26. Yağ fazı: Su fazı hacmi (ÖN10-12) değiştirilerek hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı ($n=3$)	120
Şekil 3.27. Kriyoprotektan varlığında farklı DCM:Etanol oranı (ÖN17-19) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı ($n=3$)	121

Şekil 3.28. Kriyoprotektan varlığında farklı yağ fazı: su fazı hacmi (ÖN17, 20-21) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)	121
Şekil 3.29. Kriyoprotektan varlığında farklı polimer:liyofilize ekstre oranı (ÖN17,22-23) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)	122
Şekil 3.30. Organik faz bileşeni DCM yerine aseton kullanılarak farklı polimer: liyofilize ekstre oranı (ÖN24-25, 27) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)	122
Şekil 3.31. Organik faz bileşeni DCM yerine aseton kullanılarak farklı yağ fazı:su fazı hacmi oranı (ÖN25-26) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında % kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)	123
Şekil 3.32. X ₁ (PCL Miktarı) ve X ₂ (PVA Konsantrasyonu) değişkenlerinin CCD tasarımıyla elde edilen RSM grafikleri; (A) Y ₁ (%Enkapsülasyon etkinliği), (B) Y ₂ (Partikül büyüklüğü), (C) Y ₃ (PDI), (D) Y ₄ (Zeta potansiyel), (E) Y ₅ (%Etkin madde yükleme kapasitesi), (F) Y ₆ (%AÇEM 48.sa)	126
Şekil 3.33. Optimize edilmiş <i>H.perforatum</i> yüklü nanopartikül formülasyonunun istenirlik eğrisi. (A) Bar istenirlik grafiği, (B) 3B-istenirlik grafiği ve (C) Kontur-istenirlik grafiği	129
Şekil 3.34. Optimize edilmiş <i>H.perforatum</i> yüklü nanopartikül formülasyonundan ve liyofilize <i>H.perforatum</i> ekstresinden %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)	130
Şekil 3.35. Liyofilize <i>H.perforatum</i> ekstresi ve optimize edilmiş <i>H.perforatum</i> yüklü nanopartikülün ışık maruziyeti öncesi ve 7 gün boyunca güneş ışığı ile maruziyetinden sonra HPLC ile elde edilen hiperisine ait kromatogramlar (A) ve hiperisin yüzdesi grafiği (B)	132
Şekil 3.36. Nanopartikül formülasyonuna ait DSC termogramları; A) liyofilize <i>H.perforatum</i> ekstresi, B) PCL polimeri, C) Fiziksel karışım ve D) Optimize edilmiş <i>H.perforatum</i> yüklü nanopartikül	133
Şekil 3.37. Nanopartikül formülasyonuna ait FTIR spektrumları; A) Optimize edilmiş <i>H.perforatum</i> yüklü nanopartikül, B) Boş PCL nanopartikül, C) liyofilize <i>H.perforatum</i> ekstresi ve D) <i>H.perforatum</i> ekstresine ait literatürdeki FTIR spektrumu	134
Şekil 3.38. Farklı dolgu desenlerinde 3B baskısı alınan film örneklerinin görselleri	137
Şekil 3.39. Film formülasyonlarının görselleri (F4-F14 (Rectilinear-konik tip) , F15 (Rectilinear-Blunt tip), F18 (Triangles), F19 (Grid), F20 (Honeycomb))	139
Şekil 3.40. Farklı plastizer oranı (F3-F6) ve etkin madde miktarı (F6-F9) kullanılarak konik tip baskı ucu ile 3B basılan film formülasyonlarına ait şişme derecesi sonuçları (n=3)	141
Şekil 3.41. Etkin madde oranları değiştirilerek 25 Gauge blunt tip baskı ucu ile 3B basılan film formülasyonlarına ait şişme derecesi sonuçları (n=3)	141
Şekil 3.42. Ek kurutma ve katman sayısı değiştirilerek 3B hazırlanan film formülasyonlarına ait şişme derecesi sonuçları(n=3)	142

Şekil 3.43. Aynı içerikte farklı desenlerde (F18 triangles; F19 Grid; F20 honeycomb) 3B basılan film formülasyonlarına ait şişme derecesi sonuçları ($n=3$)	142
Şekil 3.44. Ek kurutma olmadan (F12), ek kurutma ve katman sayısı (F15-16) değiştirilerek hazırlanan film formülasyonlarında (Çizelge 2.18.) borik asitin <i>in vitro</i> salım profili ($n=3$)	143
Şekil 3.45. Aynı içerikte farklı desenlerde (F18 triangles; F19 Grid; F20 honeycomb) 3B basılan film formülasyonlarında (Çizelge 2.19.) borik asitin <i>in vitro</i> salım profili ($n=3$)	143
Şekil 3.46. X_1 (Desen) ve X_2 (Borik asit miktarı)'nın RSM grafikleri; (A) Y_1 (Kalınlık), (B) Y_2 (%Yükleme etkinliği), (C) Y_3 (Adezyon kuvveti), (D) Y_4 (Mekanik direnç), (E) Y_5 (Elastikiyet), (F) Y_6 (Young's modül), (G) Y_7 (Şişme Derecesi 15.dk), (H) Y_8 (%Kümülatif AÇEM 15.dk)	147
Şekil 3.47. Optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyonunun istenirlik eğrisi. (A) Bar-istenirlik grafiği, (B) 3B-istenirlik grafiği ve (C) Kontur-istenirlik grafiği.	150
Şekil 3.48. Optimize edilmiş Borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyondan <i>in vitro</i> salım grafiği ($n=3$)	151
Şekil 3.49. Optimize edilmiş Borik asit yüklü film formülasyonuna ait SEM görüntüleri	153
Şekil 3.50. Farklı dolgu desenlerinde 3B basılmış formülasyonlara ait 3B Mikro-BT görüntüleri	153
Şekil 3.51. Film formülasyonuna ait DSC termogramları; A) Borik asit, B) fiziksel karışım, C) Kitozan ve D) Optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film	155
Şekil 3.52. Film formülasyonuna ait FTIR spektrumları; A) Optimize edilmiş Borik asit yüklü 3B basılmış film, B) fiziksel karışım, C) Borik asit, D) Kitozan ve E) Borik asite ait literatürdeki FTIR spektrumu	156
Şekil 3.53. Yara örtüsü formülasyonuna ait şişme derecesi sonuçları ($n=3$)	157
Şekil 3.54. Optimize nanopartikül, liyofilize <i>H.perforatum</i> ekstresi ve yara örtüsü formülasyonundan <i>in vitro</i> kümülatif hiperisin salım profili ($n=3$)	158
Şekil 3.55. Optimize film ve yara örtüsü formülasyonundan <i>in vitro</i> borik asit salım profili ($n=3$)	160
Şekil 3.56. Optimum nanopartikül, optimum film ve yara örtüsü örneklerine ait SEM görüntüsü (A) Yüzey görüntüleri, (B) Yara örtüsü formülasyonunun yan kesit görüntüsü	162
Şekil 3.57. Boş nanopartikül yüklü boş film, <i>H.perforatum</i> içeren nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film ve yara örtüsü formülasyonlarına ait 3B mikro-BT görüntüleri	163
Şekil 3.58. Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 24, 48 ve 72 saat sonra deneysel gruplara göre hücre tabakası yayılımının değişimi (10x büyütme)	165
Şekil 3.59. Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 24, 48 ve 72 saat sonra deneysel gruplara göre hücre tabakası yayılımının değişimi (40x büyütme)	166
Şekil 3.60. Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 72 saat sonra deneysel gruplara göre (negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu, Grup 2: boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: <i>H.perforatum</i> içeren nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: Borik asit içeren film ve Grup 5: yara örtüsü) (A) Canlı hücre sayısının değişimi, (B) % hücre büyümesi inhibisyonu; sonuçlar pozitif kontrol grubuna bağlı olarak verilmiştir.	167

Şekil 3.61. Gruplara ekstraksiyon sıvılarının eklenmesinden 0, 12, 24, 36 saat sonra çizik alanlara hücre göçünün mikroskopik incelemesi (ölçek: 50 µm).	169
Şekil 3.62. Çizgi kalınlığı (%) ve inkübasyon süresine (saat) bağlı olarak çizginin kapanması durumunun değerlendirilmesi	170
Şekil 3.63. <i>In vivo</i> uygulanan formülasyonlarda zamana bağlı yara kapanmasının takibine ait görseller	171
Şekil 3.64. <i>In vivo</i> uygulanan formülasyonlarda zamana bağlı yara kapanma yüzdesinin gruplara göre takibine ait sonuçlar	171
Şekil 3.65. <i>In vivo</i> uygulanan formülasyonlarda zamana bağlı yara alanındaki değişimin gruplara göre takibine ait sonuçlar	172
Şekil 3.66. Hazırlanan formülasyonların tedavideki etki gücünün değerlendirildiği <i>in vivo</i> çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin histopatoloji sonuçları Şekillerde Kabuk (K), Fibröz doku (F), Hiperemik damarlar (H), Neovaskülarizasyon (oklar veya siyah oklar), Kanama (beyaz oklar), Yara kenarındaki normal dermis dokusu (N), Epitel (E), Adipoz doku (A) ve Hemosiderofaji (beyaz daireler) gösterilmiştir. Hidropik dejenerasyon alanları ise siyah daireler ile işaretlenmiştir.	176

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Ticari ürün haline gelmiş film ve hidrojel yara örtüleri	19
Çizelge 1.2. <i>H.perforatum</i> 'da yer alan total hiperisinlerin fizikokimyasal özellikleri	39
Çizelge 1.3. Borik asit'in fizikokimyasal özellikleri	44
Çizelge 2.1. Hiperisinlerin metanol ortamında HPLC yöntemi parametreleri	56
Çizelge 2.2. Bitki Künyesi	62
Çizelge 2.3. Farklı karıştırma hızı (ÖN1-ÖN5) ve farklı PVA konsantrasyonu (ÖN3, ÖN6-7) ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları	66
Çizelge 2.4. Ek karıştırma olarak prob sonikasyon uygulaması ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları	66
Çizelge 2.5. Su fazı hacmi değiştirilerek hazırlanan nanopartikül formülasyonları	67
Çizelge 2.6. Farklı DCM:Etanol oranı (ÖN13-15) ve kriyoprotektan konsantrasyonu (ÖN13, ÖN16-17) değişimi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları	67
Çizelge 2.7. Kriyoprotektan varlığında farklı DCM:Etanol oranı (ÖN17-19), yağ fazı: su fazı hacmi (ÖN17, 20-21) ve polimer:ekstre oranı (ÖN17,22-23) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonları	68
Çizelge 2.8. Organik faz bileşeni DCM yerine aseton kullanılarak farklı polimer:ekstre oranı (ÖN24-25, 27) ve yağ fazı:su fazı hacmi oranı (ÖN25-26) kullanılarak nanopartikül formülasyonları	68
Çizelge 2.9. Nanopartikül optimizasyonu için faktörler (bağımsız değişkenler) ve yanıtlar (bağımlı değişkenler)	71
Çizelge 2.10. CCD tasarıma göre optimum nanopartikül formülasyonu	72
Çizelge 2.11. Farklı molekül ağırlıklı polimer, plastizer ve borik asit ile çözücü dökme yöntemiyle ile hazırlanan önformülasyonlar	73
Çizelge 2.12. Borik asit oranı değişen film formülasyonları	73
Çizelge 2.13. Değişen kitozan oranlarında hazırlanan film formülasyonları	74
Çizelge 2.14. Borik asidin formülasyona ilave şekli farklı olan film formülasyonları	74
Çizelge 2.15. Sabit borik asit ve plastizer varlığında değişen oranlarında MC ile hazırlanan jel formülasyonları	75
Çizelge 2.16. Farklı oranda kitozan ile hazırlanan jellerin farklı cihaz parametreleri (%doluluk oranı, katman yüksekliği, baskı basıncı) ile ön baskı çalışmaları.	76
Çizelge 2.17. Farklı plastizer, plastizer oranı ve borik asit miktarı kullanılarak konik tip baskı ucu ile basılan film formülasyonları	77
Çizelge 2.18. Borik asit oranları değiştirilerek 25 Gauge blunt tip baskı ucu ile basılan film formülasyonları	77
Çizelge 2.19. Ek kurutma ve katman sayısı değiştirilerek hazırlanan film formülasyonları	78

Çizelge 2.20. Aynı içerikte farklı desenlerde 3B basılan film formülasyonları	78
Çizelge 2.21. 3B baskı alınan desenler	78
Çizelge 2.22. Film optimizasyonu için faktörler (bağımsız değişkenler) ve yanıtlar (bağımlı değişkenler)	83
Çizelge 2.23. CCD tasarıma göre optimum film formülasyonu	84
Çizelge 2.24. Sitotoksosite testi değerlendirme kriterleri	88
Çizelge 2.25. Sitotoksik cevap indeksi ve sitotoksosite değerlendirmesi	88
Çizelge 2.26. Deney hayvanları üzerinde yara sonrası yapılacak tek/kombine uygulamalar ve gruplandırması	90
Çizelge 3.1. Hiperisin standardının metanol ortamında HPLC yöntemiyle hiperisin miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar	101
Çizelge 3.2. Psödohiperisin standardının metanol ortamında HPLC yöntemiyle psödohiperisin miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar	101
Çizelge 3.3. Hiperisin standardının <i>in vitro</i> çözünme ortamında HPLC yöntemiyle miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar	102
Çizelge 3.4. Total hiperisinin metanol ortamındaki UV spektrofotometre yöntemiyle miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar	102
Çizelge 3.5. Borik asitin UV spektrofotometrik yöntemle %1,5 (h/h) sulu asetik asit ortamındaki miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar	103
Çizelge 3.6. Borik asitin UV spektrofotometrik yöntemle PBS ortamındaki miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar	103
Çizelge 3.7. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar	104
Çizelge 3.8. Psödohiperisin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar	105
Çizelge 3.9. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle PBS ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar	106
Çizelge 3.10. Hiperisin standardının metanol ortamında UV spektrofotometre yöntemiyle miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar	107
Çizelge 3.11. Borik asitin %1,5 (h/h) asetik asit ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar	108
Çizelge 3.12. Borik asitin PBS ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar	109
Çizelge 3.13. Etkin maddelerin miktar tayini yönteminin DL ve QL değerlerine ait bulgular	110
Çizelge 3.14. Etkin maddelerin çeşitli ortamlarda %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon parametreleri	113
Çizelge 3.15. Partikül formülasyonlarının ortalama PB, PDI, ZP ve %EE sonuçları	116
Çizelge 3.16. CCD metoduyla elde edilen liyofilize <i>H.perforatum</i> ekstresi yüklü nanopartiküllere ait DoE verileri	124

Çizelge 3.17. CCD metoduyla elde edilen liyofilize <i>H.perforatum</i> ekstresi yüklü nanopartiküllere çoklu regresyon analizi sonuçları	125
Çizelge 3.18. Optimize edilmiş parametreler ile tahmin edilen ve gözlemlenen yanıt değerleri	129
Çizelge 3.19. Optimize edilmiş <i>H.perforatum</i> yüklü nanopartikül formülasyonuna ait <i>in vitro</i> salım kinetik verileri	131
Çizelge 3.20. Önformülasyon çalışmalarına ait bulgular ($n=3$)	135
Çizelge 3.21. Değişen polimer oranlı kitozan jeller ile farklı cihaz parametreleri denenerek yapılan baskı ön çalışmalarına ait bulgular	136
Çizelge 3.22. 3B baskı ile borik asit yüklü filmlerde baskı öncesi jellerde viskozite, filmler için kalınlık ve etkin madde yükleme etkinliği sonuçları ($n=3$)	138
Çizelge 3.23. 3B Baskı ile borik asit yüklü filmlerde filmlerde gerilme direnci ve adezyon sonuçları ($n=3$)	140
Çizelge 3.24. CCD metoduyla elde edilen borik asit yüklü 3B basılmış filmlere ait DoE verileri	145
Çizelge 3.25. CCD metoduyla elde edilen borik asit yüklü 3B basılmış filmlerde çoklu regresyon analizi sonuçları	146
Çizelge 3.26. Optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyondan <i>in vitro</i> salım kinetikleri	152
Çizelge 3.27. CCD metoduyla elde edilen borik asit yüklü 3B basılmış filmlerden birer örnekte Mikro-BT tarama sonuçları	154
Çizelge 3.28. Yara örtüsüne ait kalınlık, gerilme direnci, elastikiyet, young's modül, adezyon kuvveti, su buharı geçirgenliği ve oksijen geçirgenliği sonuçları ($n=3$)	157
Çizelge 3.29. Yara örtüsü formülasyonuna ait <i>in vitro</i> hiperisin salım kinetikleri	159
Çizelge 3.30. Optimize yara örtüsü formülasyonuna ait <i>in vitro</i> borik asit salım kinetikleri	161
Çizelge 3.31. Boş nanopartikül yüklü boş film, <i>H.perforatum</i> içeren nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film ve yara örtüsü formülasyonlarına ait mikro-BT tarama sonuçları	163
Çizelge 3.32. Yara örtüsü formülasyonunda $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\%60\pm\%5$ bağıl nemde iklim dolabında stabilite sonuçları	163
Çizelge 3.33. Antimikrobiyal aktivite analizlerine ait deney sonuçları	164
Çizelge 3.34. Sitotoksite testi değerlendirme kriterleri puanlama cetveline göre sonuçlar	168
Çizelge 3.35. Test edilen gruplar için sitotoksite değerlendirme sonuçları	168
Çizelge 3.36. Hazırlanan formülasyonların tedavideki etki gücünün <i>in vivo</i> çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin 3B mikroyapılarına ait Mikro-BT sonuçları ($n=6$)	173

1. GİRİŞ

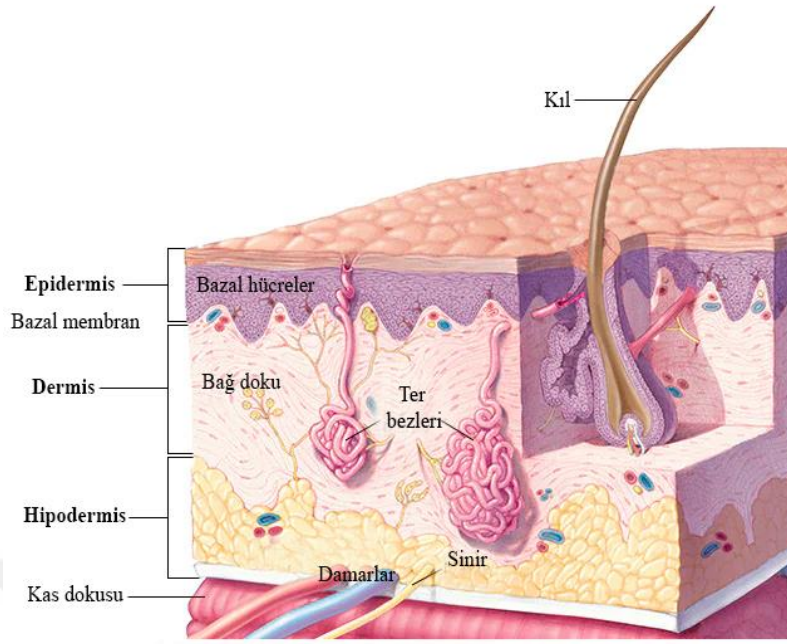
Yara iyileşmesine yönelik tedavi yöntemleri, doku rejenerasyon çalışmaları ve tedavi için hazırlanan ilaç şekilleri, son yıllarda üzerinde en çok çalışma yapılan konulardan biridir. Vücudun en büyük organı olan deri, pek çok fizyolojik görevinin yanı sıra mikrobiyal enfeksiyon gibi olası çevresel tehditlere karşı da fiziksel bir bariyerdir. Yara oluşumuyla derinin fonksiyonlarını yerine getirememesi yanında dış çevreden gelebilecek tehlikelere karşı da vücut savunmasız kalmaktadır. Bu noktada, hasarlı bariyeri geçici olarak telafi etmek ve iyileşmeyi hızlandırmak için dışarıdan doku destekleyici olarak yara örtülerine ihtiyaç duyulur. Yara örtüsü, yaralı bölgeyi dış ortamdan izole ederek koruyucu bir tabaka oluştururken, iyileşme sürecini hızlandıran etkin maddeler içerebilir, kanamayı önler, yarayı nemli tutar, fazla eksüdayı gidererek doku iyileşmesini kolaylaştırır. Yara bölgesini kurutmaya yönelik uzun yıllar süren yanlış yara bakımlarının ardından nemli ortam sayesinde yara dokusundaki epitelizasyonun hızlandığı tespit edilmiştir. Bu sebeple son yıllarda hidrofilik yapılı film formunda hazırlanmış yara örtüleri odak noktası haline gelmiştir. Farmasötik alandaki gelişmelerle birlikte özellikle kişiselleştirilmiş ilaç şekillerinin üretiminde umut vaat eden üç boyutlu (3B) baskı teknolojisinin de kullanıma girmesiyle geleneksel yöntemlerle üretilmesi mümkün olmayan bireysel ihtiyaçlara yönelik ilaç şekillerinin 3B baskı ile üretilmesi, farmasötik alanda yeni bir çığır açmıştır. Yara tedavisinde tercih edilen tedavi yaklaşımlarından biri yara iyileştirici etkisi bilinen *Hypericum perforatum* (*H.perforatum*) gibi tıbbi bitkilerin kullanımınıdır. Bunun yanı sıra açık yaraların çoğunluğunda mikrobiyal kontaminasyon tespit edilmektedir ve iki yönlü tedavinin gerçekleştirilmesi için antimikrobiyal ilaç kullanımı da gerekmektedir. Bor türevleri antiseptik ve antiviral aktivitelerinden dolayı çeşitli farmasötik formülasyonlarda kullanılmaktadır. Bu antiseptik ajanlar aynı zamanda derin yara tedavilerinde de kullanılabilir.

Araştırmamızda, ülkemizde doğal olarak bulunan yara iyileştirici *H.perforatum* ve yine ülkemiz doğal kaynaklarından olan antimikrobiyal etkili bor kombinasyonu sayesinde sinerjistik etki oluşturabilecek yerel bir yara örtüsü formülasyonunun 3B olarak geliştirilebileceği hipotezinden yola çıkılmıştır. Biyolojik ortamda bozunabilen polimerlerden yararlanarak hazırlanan ve yaralı bölgeye topikal olarak uygulanabilen, *H.perforatum* yüklü nanopartikül içeren bor yüklü yara örtüsü şeklinde yeni bir ilaç şeklinin geliştirilmesi planlanmıştır.

1.1. Deri Dokusu ve Deri Dejenerasyonu: Yara

Deri, insan vücudundaki en büyük organ olarak, vücut iç ortamını dış dünyadan ayıran ve koruyan temel bir bariyer işlevi görmektedir. Bu bariyer, çevredeki zararlı faktörlerin doğrudan vücuda girişini engelleyerek iç ortamın düzeninin korunmasını sağlar. Aynı zamanda, deri, insan vücudunun doğal bağışıklık savunmasında kritik bir role sahiptir. Bunun yanı sıra, derinin yüzeyinde yer alan yoğun kıl folikülleri ve sinir uçları sayesinde salgılama, sıcaklık düzenleme ve dış uyarılara yanıt verme gibi ek fonksiyonları da bulunmaktadır (Alavi vd., 2024; Dai vd., 2020; Huang vd., 2022; Kepekçi vd., 2021; Pena ve Martin, 2024; Radmanesh vd., 2022; Wang vd., 2022).

Derinin sağlam ve bütün halde olması, deri fonksiyonlarının kesintisiz şekilde sürdürülebilmesi için hayati öneme sahiptir. Normal bir deri, dışta epidermis, altta dermis ve hipodermis olmak üzere üç temel katmandan oluşmaktadır (Pena ve Martin, 2024; Radmanesh vd., 2022; Tiwari vd., 2023; Wang vd., 2022) (Şekil 1.1.). Epidermis, çoğunlukla keratinositlerden meydana gelir ve yüzeyinde kıl folikülleri, ter ve yağ bezlerinin açıklıkları gibi deri ekleri bulunur. Bu ekler, dermis tabakasına kadar uzanır. Epidermisin en alt tabakasında yer alan bu bazal hücreler kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahiptir, spinöz hücrelere dönüşerek epidermisteki hücre dengesini korur. Dermis, epidermisin altında bulunan yoğun bir bağ dokusudur ve kılcal damarlarla zengin papiller tabaka ile esas olarak kolajen liflerden oluşan retiküler tabakaya ayrılır. Papiller tabaka, kılcal damar ağıyla epidermise gerekli besinleri taşıırken, retiküler tabakadaki kolajen lifleri ağ benzeri bir yapı oluşturarak deriye dayanıklılık ve esneklik kazandırır. Fizyolojik koşullarda, epidermisin bazal tabakasındaki keratinositler, dermisteki kılcal damarlardan besin alarak bir kısmı spinöz hücrelere farklılaşır ve epidermisteki hücre sayısını dengeler. Epidermal hücreler zamanla daha dış tabakalara geçer ve en dış tabakadaki keratinositlerin dökülmesiyle bu süreç tamamlanır. En derin tabaka olan hipodermis ise, diğer adıyla subkutan yağ dokusu, vücuda hem termal izolasyon sağlayarak ısı dengesini korur hem de dış darbeler karşısında mekanik bir tampon görevi görür (Dai vd., 2020). Derinin bu yoğun ve sürekli yapısı, vücudu dışardan gelebilecek zararlı uyarılardan ve maddelerden koruyarak bağışıklık sistemine katkı sağlar.



Şekil 1.1. Derinin anatomik yapısı ve katmanları (Anonymous)

Deri, vücudun dış çevreyle en geniş yüzeyde temas eden kısmı olduğu için sürekli bir maruziyet durumunda olması deri hasarlarının kaçınılmaz hale gelmesine yol açar. Derinin koruyucu kapasitesinin bir sınırı bulunmaktadır. Dış çevreden gelen yaralanma faktörleri belirli bir eşiği aştığında, derinin bütünlüğü bozulur ve koruyucu etkisi zayıflayabilir ya da tamamen ortadan kalkabilir. Ayrıca, hastalıklar veya ilaçların etkisiyle derinin yapısında meydana gelen değişiklikler, dış uyarılara ve hasarlara karşı direncini azaltabilir. Bu durum, normal şartlar altında tolere edilebilecek hafif uyarıların bile deri yapısını bozarak işlev kaybına yol açmasına neden olabilir (Alavi vd., 2024; Huang vd., 2022; Kepekçi vd., 2021; Wang vd., 2022). Ayrıca deri yüzeyinde stafilokok, streptokok, kandidalar ve patojenik olmayan mikrobakteriler gibi çeşitli mikroorganizma türleri bulunur. Deri hasar gördüğünde, bu organizmalar yara çevresinde birikerek enfeksiyon oluşturabilir, bu da dokularda sıvı kaybına yol açabilir ve ciddi ikincil travmalara neden olabilir.

Mekanik, fiziksel veya metabolizma ile ilişki rahatsızlıklar sebebiyle hasar gördüğünde derinin anatomik yapısındaki bütünlüğün bozulması ve epitel dokusunun sürekliliğinin kaybı **yara** olarak tanımlanmaktadır (Alemdaroglu vd., 2006; Boateng vd., 2008; Kepekçi vd., 2021; Kurtoglu ve Karataş, 2009; Liu vd., 2018; Moreira vd., 2024; Naseri-Nosar ve Ziora, 2018; Nguyen vd., 2023; Tiwari vd., 2023; Tort ve Acartürk, 2015; Wang vd., 2022). Bazı durumlarda bu hasar, daha derin katmanlara ilerleyerek alttaki bağ dokusunu da etkileyebilir. Derinin temel işlevlerinde meydana gelen bu tür bozulmalar, organizmanın homeostazını

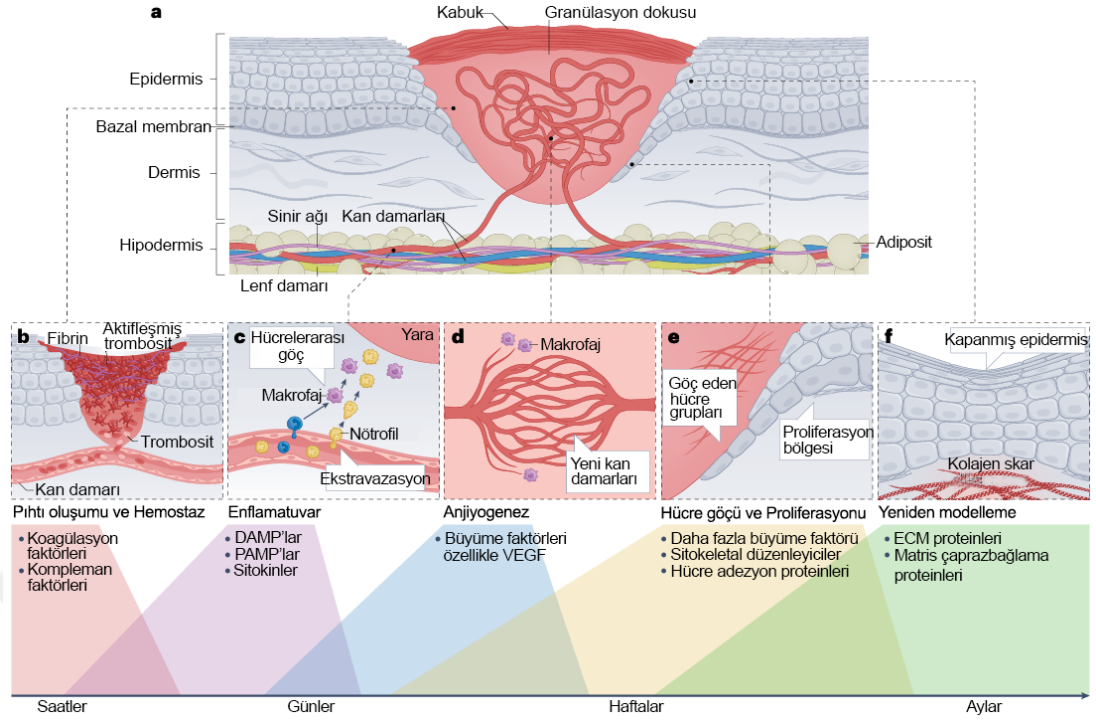
olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle, yaraların onarımı organizma için hayati bir öneme sahiptir.

Yaralar, genetik hastalıklar, yanıklar, donma, elektriksel, kimyasal, radyasyon veya sürtünme gibi nedenlerle meydana gelen akut travmalar; diyabetik ayak ülserleri, bası yaraları, venöz ve arteriyel bacak ülserleri gibi kronik rahatsızlıklar ya da cerrahi müdahaleler sonucunda oluşabilir ve farklı türde doku hasarlarına yol açabilir (Alven vd., 2022; Egozi vd., 2015; Kurtoglu ve Karataş, 2009; Naseri-Nosar ve Ziora, 2018). Yaralar, iyileşme süresine bağlı olarak akut ve kronik olmak üzere sınıflandırılabilir (Dai vd., 2020; Radmanesh vd., 2022; Tiwari vd., 2023; Tort vd., 2017; Tort ve Acartürk, 2015). **Akut yaralar**, genellikle 8-12 hafta içinde iyileşen yaralanmalar olarak tanımlanır. Bu yaralar, genellikle yanıklar, kesikler veya sıyrıklar gibi travmatik olaylar sonucunda oluşur. **Kronik yaralar**, altı haftadan uzun süre iyileşemeyen veya sık sık tekrar eden, tedavisi zor olan yaralar olarak tanımlanır. Genellikle kronik yaralar, akut bir yara olarak başlar. Yetersiz kan dolaşımı, diyabet, enfeksiyonlar veya uygun olmayan birincil tedavi gibi faktörler, normal yara iyileşme sürecini engelleyerek kronik yaraların gelişmesine neden olabilir. ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health, NIH) raporuna göre, yaklaşık 10.5 milyon hasta kronik yaralarla mücadele etmektedir (Sen, 2023). Buna ek olarak, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), her yıl yanık yaralanmalarına bağlı olarak yaklaşık 180.000 ölüm meydana geldiğini bildirmiştir. 2060 yılına kadar yara tedavisi uygun şekilde yönetilmezse, artan yaşlı nüfusla beraber, yara tedavisi en önemli acil tıbbi müdahalelerden biri haline gelecektir.

1.1.1. Yara İyileşme Süreci

Normal yara iyileşmesi, sürekli ve dinamik bir süreçtir. Bu süreçte, çeşitli hücreler, yara bölgesindeki mikroçevrenin ve büyüme faktörlerinin değişimiyle yara bölgesine düzenli bir şekilde göç eder, işlevlerini yerine getirir, sırasıyla çoğalır ve kolajen proteini ve polisakkarit gibi yara iyileşmesi için gerekli sentetik maddeleri salgılar ve sonunda yara iyileşmesini tamamlar (Alemdaroglu vd., 2006; Degim vd., 2002; Tort ve Acartürk, 2015; Wang vd., 2022) (Şekil 1.2.). Bu süreç temel olarak dört ana aşamaya ayrılır:

- Pıhtı oluşumu ve hemostaz
- Enflamasyon
- Hücre göçü ve proliferasyonu
- Yeniden modelleme



Şekil 1.2. Yara iyileşme aşamalarının şematik gösterimi (Pena ve Martin, 2024)

Bir yaranın iyileşmesi için öncelikle bariyer tabakasındaki hasarın bir pıhtı ile kapatılması gerekir (Şekil 1.2.b). Damar duvarının zedelenmesiyle trombositler damar duvarındaki kolajen ile temas eder ve geçici bir pıhtı oluşturarak kan kaybını durdurur ve hemostaz sağlanır. Bu geçici kalkanın altında, enflamatuvar yanıtlar aktive olur (Şekil 1.2.c). Lenfositler, vazodilatasyona neden olan faktörleri kan damarlarına salarak kılcal damar geçirgenliğini artırır. Nötrofiller yaralanma bölgesine ulaşır ve bakteriler ile hücrel döküntüleri fagosit eder. Monositler yara bölgesine nüfuz eder ve makrofajlara dönüşerek apoptoz halindeki hücreleri, hasar görmüş hücre dışı matrisi (ECM; Extracellular matrix), döküntüleri ve bakterileri temizler. Yara bölgesinde lokal ödem, ağrı, kızarıklık ve sıcaklık gibi enflamasyon belirtileri gözlenir. Bu süreç genellikle 1-4 gün arasında tamamlanır. Yaralanmayı takip eden 2. günde başlayan ve yaklaşık 3 hafta süren hücre göçü ve proliferasyon evresinde, geçirgen bir bariyer oluşur, re-epitelizasyon ve kontraksiyon süreçleri başlar (Şekil 1.2.e). Derinin farklı katmanlarından gelen hücreler, yaranın kenarlarından göç ederek boşluğu doldurur. Yara bölgesinde mikrodolaşım düzenlenerek dokunun güçlendirilmesi sağlanır. İnflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler ve büyüme faktörleri, fibroblastları aktive eder ve bu hücreler yeni ECM ile kolajen sentezine başlar. Kolajen birikimi, yaranın gerilmeye karşı direncini artırır (Şekil 1.2.e). Epitel hücreleri, yara yüzeyinde yeni bir yapı oluşturur. Ayrıca fibroblastların bir kısmı miyofibroblastlara dönüşerek yara kontraksiyonuna katkıda bulunur. Derinin tüm hücre türleri onarım sürecine katkıda bulunur

ve bu düzenlenmiş hücre davranışlarını çeşitli mekanik ve kimyasal sinyaller tetikler. Bu sinyallerin çoğu, hasar belirtilerine ve savunma amacıyla yaraya çekilen enflamatuvar hücrelerden gelen patojen kaynaklı sinyallere dayanır. Örneğin fibroblastlar, granülasyon dokusunun oluşumunu, miyofibroblastların farklılaşmasını ve epitel hücrelerinin yara kenarından göç etmesini teşvik eden dönüşüm büyüme faktörü beta (TGF- β ; Transforming Growth Factor-Beta) gibi sitokinler üretir. Onarım sürecinin bazı unsurları geçici ve geri dönüşümlüdür. Örneğin, yara bölgesindeki anjiyojenik yanıt geçici bir süreç iken kolajen birikmesi kalıcı bir süreçtir (Şekil 1.2.d). Yeniden modelleme aşaması yara iyileşmesinin son aşamasıdır, proliferasyonun tamamlanmasını takiben 3. haftada başlar ve birkaç aya kadar devam eder (Şekil 1.2.f). Yara bölgesindeki fibroblast sayısı azalır, kolajen üretimi dengelenir ve epitelizasyon süreci tamamlanır. Bu aşamada sağlıklı dokunun yapısal kolajen ağı yeniden oluşturulur. Kontraksiyon, bu dönemde yara dokusunun yeniden şekillenmesiyle meydana gelir. Yaklaşık 6 hafta içinde yara, başlangıçtaki mekanik gücünün %80-95'ini kazanır. Bu süreçte yara renginin solması, skar dokusunun oluşması ve gerilim direncinin artması gözlenir. Bu evre, kontrol ve tedavi uygulaması olmadan derinin kendini onarması için 6-12 ay, hatta bazı durumlarda 24 aya kadar sürebilir (Alavi vd., 2024; Alven vd., 2022; Baktir, 2020; Huang vd., 2022; Pena ve Martin, 2024; Tiwari vd., 2023; Wang vd., 2022).

1.2. Yara Bakımı

Yara oluşumuna bağlı olarak yara bakımında yöntemler değişiklik gösterebilir; ancak yara iyileşmesi için temel faktörler arasında nem, oklüzyon, debridman ve doku oksijenlenmesi yer almaktadır (Fonder vd., 2008; Kurtoğlu ve Karataş, 2009).

Nem: Uzun yıllar boyunca yanlış uygulamalarla yara bölgesini kurutmaya yönelik bakım yöntemleri kullanılmasına rağmen, nemli bir ortamın yara iyileşmesini hızlandırdığı kanıtlanmıştır. Aşırı kuru yaralarda doku kaybının arttığı ve iyileşmenin geciktiği tespit edilmiştir. Nemli ortamın, yara dokusunda epitelizasyonu hızlandırdığı ve hastalarda ağrıyı azalttığı belirtilmiştir. Ancak, aşırı nem durumunda maserasyon oluşabilir ve çevredeki dokular zarar görebilir. Bu nedenle, nem kontrolü yara bakımında kritik bir öneme sahiptir (Dadashzadeh vd., 2019; Devi ve Dutta, 2017; Gomes Neto vd., 2019; Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Hafezi vd., 2019; Hurler vd., 2013; Khan vd., 2016; Parvez vd., 2012; Singh ve Pal, 2012; Wathoni vd., 2016).

Oklüzyon: Açık yaralarda, kontaminasyon, kolonizasyon veya enfeksiyon durumları sıkça gözlenir (Dabiri vd., 2016; Fonder vd., 2008; Simoes vd., 2018). Kontaminasyon sırasında bakteri sayısı artmazken, kolonizasyon durumunda bakteriler çoğalır ancak yara dokusuna ciddi bir zarar vermez. Enfeksiyon oluştuğunda ise bakteri üremesi yara iyileşmesini engelleyerek dokuya zarar verebilir. Oklüzyon, yara bölgesini mikrobiyal enfeksiyonlara ve çevresel faktörlere karşı koruyan bir bariyer sağlar ve bu sayede enfeksiyon oranlarını azaltır.

Debridman: Yara dokusundaki ölü hücrelerin, bozulmuş fibrinlerin, ECM proteinlerinin, eksüdaların ve bakterilerin yara bölgesinden uzaklaştırılması işlemidir (Fonder vd., 2008; Liu vd., 2018). Bu işlem, cerrahi yöntemlerle, ıslak sargıların kuruyup yara dokusuna yapışmasının ardından kaldırılmasıyla, nemli ortamda otolitik ya da enzimatik yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Kuru ve eksüda üretmeyen nekrotik dokuların uzaklaştırılması, yara iyileşmesini hızlandırmak için gereklidir (Dabiri vd., 2016). Venöz ülserler veya piyoderma gangrenozum gibi fazla eksüda üreten yaralarda, aşırı nemin neden olduğu maserasyonu önlemek için yüksek absorpsiyon kapasitesine sahip yara örtülerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, örtü ya da fiziksel baskı uygulanırken, fazla eksüda üretimi de göz önünde bulundurulmalıdır. Derin, tünel şeklindeki yaralar (örneğin arteriyel ülserler, diyabetik ülserler ve basınç yaraları) için yara boşluğunu etkili bir şekilde doldurup fazla eksüdayı emebilen yara örtüleri, iyileşmeyi hızlandırabilir.

Doku Oksijenlenmesi: Yara dokusunun oksijenlenmesi, hücrelerin beslenmesi, gelişmesi ve büyümesi için hayati bir role sahiptir. Enzimatik ve hücresel pek çok süreç oksijen varlığına bağlıdır (Tandara ve Mustoe, 2004). Hipoksi, yara dokusunda hücresel ölümle sonuçlanabilir ve iyileşme sürecini ciddi şekilde engelleyebilir.

1.3. Yara Örtüsü

Deri, mekanik, fiziksel ya da metabolizmaya bağlı rahatsızlıklar nedeniyle hasar gördüğünde, koruyucu bariyer işlevini kaybeder ve yara oluşur (Boateng vd., 2008; Kurtoglu ve Karataş, 2009; Muwaffak vd., 2017; Naseri-Nosar ve Ziora, 2018; Simoes vd., 2018). Yara oluşumu, sadece derinin işlevlerini yerine getirmesini engellemekle kalmaz, aynı zamanda vücudu dış çevreden gelebilecek tehlikelere karşı savunmasız bırakır. Bu durumda, hasarlı bariyeri geçici olarak telafi etmek ve iyileşme sürecini desteklemek için doku destekleyici yara örtülerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Yara örtüsü; yaralı bölgeyi dış ortamdan izole ederek yara üzerinde koruyucu bir tabaka oluşturan, kanamayı önleyen, yarayı nemli tutan, fazla eksüdayı gideren, iyileşme sürecini kolaylaştırmak ve hızlandırmak için çeşitli etkin maddelerin salımına izin veren, doku ile uyumlu materyaller olarak tanımlanabilir (Al-Sheerazee vd., 2024; Boateng vd., 2008; Gianino vd., 2018; Kurtoğlu ve Karataş, 2009; Maver vd., 2015; Muwaffak vd., 2017; Naseri vd., 2014; Okur vd., 2020; Tort ve Acartürk, 2015).

Yara bakımında etkin bir iyileşme sağlanabilmesi için kullanılan yara örtüsünün belirli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler aşağıdaki şekilde sıralanabilir (Ahmady vd., 2022; Al-Sheerazee vd., 2024; Bal-Öztürk vd., 2024; Boateng vd., 2008; Egozi vd., 2015; Fonder vd., 2008; Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Huang vd., 2022; Jiang vd., 2016; Kamoun vd., 2017; Kumar vd., 2017; Nguyen vd., 2023; Tort ve Acartürk, 2015; Uzun vd., 2013; Zepon vd., 2019):

- *Nem Kontrolü:* Yara örtüsü, yara bölgesinde nemli bir ortam sağlayarak doku kurumasını engellemeli ve epitelizasyon sürecini desteklemelidir.
- *Gaz Geçirgenliği:* Dokuların oksijenlenmesini sağlamak ve yaranın havasız kalmasını önlemek amacıyla gaz alışverişine elverişli olmalıdır.
- *Koruma:* Yarayı çevresel faktörlere ve mikroorganizmaların neden olabileceği enfeksiyonlara karşı koruyacak şekilde bir bariyer oluşturmalıdır.
- *Eksüda Yönetimi:* Fazla eksüdayı emme kapasitesine sahip olmalı, ancak yüzeyinde doyumluk oluşmasını önleyerek çevre dokulara zarar vermemelidir.
- *Uygulama Kolaylığı:* Yara örtüsü kolayca uygulanabilir olmalı ve vücudun farklı bölgelerine uyarlanabilir bir yapıya sahip olmalıdır.
- *Travmasız Çıkarma:* Örtünün çıkarılması sırasında yaranın veya çevre dokunun zarar görmesini engelleyecek şekilde tasarlanmış olmalı ya da biyobozunur özellik göstermelidir.
- *Biyouyumluluk ve Güvenlik:* Biyouyumlu materyallerden üretilmeli, alerjik reaksiyonlara neden olmamalı ve biyogüvenli olmalıdır.
- *Sterilite:* Yaraya uygulandığında enfeksiyon riskini minimize edecek şekilde steril olmalıdır.
- *Isı Yalıtımı:* Yaranın ısı kaybını önleyecek bir yalıtım sağlamalı ve yara mikroçevresini korumalıdır.
- *Ekonomiklik:* Geniş kullanım alanı ve uygun maliyet sunarak sağlık hizmetlerine erişimi kolaylaştırmalıdır.

Bu özellikler, yara örtüsünün hem tedavi edici etkisini artırmakta hem de hasta konforunu iyileştirmekte önemli bir rol oynamaktadır.

Yara örtülerine ilişkin ilk yazılı belgeler, MÖ 1550 yılında eski Mısır Ebers Papirüslerinde bulunmaktadır. Bu belgelerde, bitkisel liflerin sıvı emme kabiliyeti, hayvansal yağların bariyer özellikleri ve balın antibakteriyel etkileri kullanılarak keten şeritler üzerinde uygulanan yara örtülerinden bahsedilmektedir (Dhivya vd., 2015; Fonder vd., 2008; Jürgens vd., 2006). Daha sonraki dönemlerde ise şarap, sirke ve kaynatılmış su ile ıslatılmış yün ve pamuk gibi materyaller yara örtüsü olarak kullanılmıştır. Zamanla teknolojinin ilerlemesiyle birlikte yara örtülerinde büyük bir çeşitlilik ve gelişim sağlanmıştır. Yara örtüleri, işlevlerine, üretildikleri materyallere ve fiziksel formlarına göre çeşitli kategorilere ayrılmaktadır. En yaygın sınıflandırma ile yara örtüleri geleneksel ve modern olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (Boateng vd., 2008; Dhivya vd., 2015; Fonder vd., 2008; Kamoun vd., 2017; Karagül vd., 2024; Nguyen vd., 2023; Saghazadeh vd., 2018; Tiwari vd., 2023; Wang vd., 2023). Gazlı bezler, hidrofil pamuk ve yün gibi basit malzemelerden üretilen örtüler, geleneksel yöntemler arasında yer almaktadır. Teknolojinin gelişimiyle birlikte doğal veya sentetik polimerlerden üretilen film, hidrojel, skafold, nanolif ve sünger gibi çeşitli fiziksel formlarda modern yara örtüleri geliştirilmiştir. Bu modern örtüler, geleneksel malzemelerin eksik yönlerini tamamlayarak daha etkili çözümler sunmaktadır.

1.3.1. Geleneksel Yara Örtüleri

Tıbbi gazlı bezler, yara bakımında en sık kullanılan ürünlerden biridir ve bu kategorinin en bilinen örneklerindendir (Fonder vd., 2008; Kamoun vd., 2017; Saghazadeh vd., 2018). Pamuk, suni ipek, polyester gibi materyallerden veya bu malzemelerin kombinasyonlarından dokunmuş ya da dokunmamış liflerle üretilen gazlı bezler, düşük maliyetleri, kolay üretilebilirlikleri ve kullanımları, hızlı su emme kapasiteleri ve sterilize edilebilmeleri nedeniyle tercih edilmektedir (Boateng vd., 2008; Dhivya vd., 2015; Kamoun vd., 2017; Saghazadeh vd., 2018; Tiwari vd., 2023). Ancak, tıbbi gazlı bezler ideal yara örtüsünden beklenen tüm özellikleri karşılamamaktadır ve kullanım alanlarını kısıtlayan çeşitli dezavantajları bulunmaktadır:

- *Mikrobiyal Kontaminasyona Karşı Yetersiz Koruma:* Gazlı bezler, yarayı tamamen mikrobiyal kontaminasyondan koruyamamaktadır.

- *Eksüda Yönetimi Sorunları*: Fazla eksüdaları absorbe ettikten sonra hızla doygunluğa ulaşmakta ve yüzeyde biriken eksüda, mikrobiyal enfeksiyon riskini artırmaktadır.
- *Düşük Gaz Geçirgenliği*: Yaralı dokuların oksijenlenmesini sınırlamakta, bu da iyileşme sürecini olumsuz etkilemektedir.
- *Nemli Ortam Sağlayamama*: Kuru bir yapıya sahip olduklarından yara yüzeyinde nemli bir ortam oluşturmamaktadır.
- *Yara Hasarı Riski*: Biyobozunur olmamaları nedeniyle çıkarma sırasında yara yüzeyine yapışarak kanama veya yenilenen epitel dokuda hasara neden olabilmektedir (Boateng vd., 2008; Dhivya vd., 2015; Kamoun vd., 2017; Saghazadeh vd., 2018; Tiwari vd., 2023).

Bu sorunların üstesinden gelmek amacıyla, gazlı bezlerin çeşitli kaplama ve formülasyonlarla geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Özellikle, yara bakımındaki dezavantajları azaltmak ve hasta konforunu artırmak için gazlı bezlerin adeziv olmayan bir iç yüzey ile kaplanması (örn; kitozan-Ag-ZnO nanokompozit kaplama) (Kamoun vd., 2017) veya sıvı parafin (Boateng vd., 2008) ya da vazelin emdirilmesi (Fonder vd., 2008) gibi işlemlerle bu dezavantajı elimine edilmeye çalışılmıştır. Vazelin, tuzlu su, antibiyotikler ve antiseptikler gibi katkı maddelerinin taşıyıcısı halinde veya diğer yara örtüsü ürünleri ile kombinasyon halinde hazırlanmaları ile gazlı bezlerin etkinliği artırılmış ve kullanım alanları genişletilmiştir. Xeroform™ (vazelinli gazlı bez), Bactigras™, Jelonet® ve Paratulle™ (parafinli gazlı bezler) yüzeysel yara tedavisi için ticari olarak temin edilebilen yara örtüsü örneklerindendir. Ek olarak, tıbbi gazlı bezler, doğrudan yara ile temas eden ürünler olarak sargı bezlerinden ayrılmakta ve yara örtüsü kategorisinde değerlendirilmektedir (Dhivya vd., 2015).

1.3.2. Modern Yara Örtüleri

Geleneksel yara örtülerinin, ideal yara bakım koşullarını tam anlamıyla sağlayamaması nedeniyle modern yara örtüleri geliştirilmiştir (Boateng vd., 2008; Dhivya vd., 2015; Nguyen vd., 2023; Tiwari vd., 2023). Modern yara örtüleri, genellikle doğal ve sentetik kaynaklı polimerlere dayanmakta ve bu polimerlerin çeşitli avantajları sayesinde daha etkili bir yara bakım çözümü sunmaktadır. Özellikle biyolojik olarak bozunabilen polimerlerin kullanıma girmesiyle birlikte, tedavi sonunda çıkarılma gerektirmeyen yara örtülerinin geliştirilmesi mümkün olmuştur. Bu polimerik materyaller, yalnızca yara iyileşmesini kolaylaştırmakla kalmayıp, aynı zamanda iyileşme sürecini hızlandıran etkin maddeleri taşıma özelliğine sahiptir. Ayrıca, farklı fiziksel formlarda üretilebilme yeteneği, modern yara örtülerinin

uyarlanabilirliğini ve kullanım alanlarını genişletmiştir. Bu çeşitlilik sayesinde, yara örtülerinin özelliklerini optimize ederek, farklı yara türlerine ve tedavi gereksinimlerine uyum sağlanabilmektedir.

Modern yara örtüleri, **polimerik filmler** (Goyanes vd., 2016; Muwaffak vd., 2017; Repka vd., 1999), **film ya da jel halinde hidrojel** (Ahmady vd., 2022; Ahmed vd., 2018; Ahtzaz vd., 2019; Al-Sheerazee vd., 2024; Ali vd., 2018; Aydin ve Zorlu, 2022; Bal-Öztürk vd., 2024; Choi vd., 2016; Dadashzadeh vd., 2019; Demirci vd., 2016; Demirci vd., 2015; Dharashivkar vd., 2015; Dogan vd., 2014; Egozi vd., 2015; El Hosary vd., 2020; Gainza vd., 2015; Gunes vd., 2020; Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Hafezi vd., 2019; Hurler vd., 2012; Hurler ve Skalko-Basnet, 2012; Hurler vd., 2013; Ishfaq vd., 2023; Ji vd., 2024; Jiang vd., 2016; Jin vd., 2016; Karagül vd., 2024; Kaur vd., 2019; Kim vd., 2008; Kıyan vd., 2015; Kumar vd., 2017; Li vd., 2012; Liakos vd., 2014; Mutlu vd., 2022; Nunes vd., 2011; Nunes vd., 2016; Pagano vd., 2019; Pagano vd., 2020; Parvez vd., 2012; Peles vd., 2013; Roy vd., 2010; Sagiroglu vd., 2021; Sandri vd., 2013; Shi vd., 2019; Singh ve Pal, 2012; Sohrabi vd., 2016; Sung vd., 2010; Wathoni vd., 2016; Yadollah-Damavandi vd., 2015; Yang vd., 2024; Zaman vd., 2011; Zoghi vd., 2021), **skafoldlar/iskeleler** (Boateng vd., 2023; Dinh vd., 2024; Intini vd., 2018; Khoshmaram vd., 2024; Lazaridou vd., 2024; Lin vd., 2022; Maver vd., 2018; Seok vd., 2019; Teoh vd., 2022; Yu vd., 2017), **nanolifler** (Almukainzi vd., 2022; Arezomand vd., 2024; Chen vd., 2008; Daristotle vd., 2020; Guleken vd., 2021; Ignatova vd., 2009; Meenatchi vd., 2024; Monteiro vd., 2015; Mouro vd., 2023; Naseri vd., 2014; Oliveira vd., 2024; Pourhojat vd., 2016; Sakai vd., 2024), **süngerler** (Berce vd., 2018; Elsner vd., 2011; Hong vd., 2008; Kondo ve Kuroyanagi, 2012; Öztürk vd., 2006; Ulubayram vd., 2001) ve **kompozitler** (Devi ve Dutta, 2017; Gomes Neto vd., 2019; Khan vd., 2016; Maver vd., 2015; Monteiro vd., 2024; Tao vd., 2024; Yang vd., 2024) gibi farklı fiziksel formlarda hazırlanabilir.

1.4. Yara Tedavisinde Tercih Edilen Tedavi Yaklaşımları

Doğal ürünler; bitkiler, mantarlar ve hayvanlar da dahil olmak üzere çeşitli organizmalardan elde edilen geniş bir kimyasal bileşik kategorisini ifade eder (Sut vd., 2023). Yara tedavisinde kullanılan doğal kaynaklar, yüksek biyoyumlulukları ve çevre dostu özellikleri nedeniyle sentetik maddelere kıyasla daha fazla tercih edilmektedir (Kepekçi vd., 2021). Uzun yıllar boyunca bitki ve hayvanlardan izole edilen hammaddeler, geleneksel tıpta hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır. Ancak, sentetik ilaç endüstrisinin ilerlemesiyle

doğal ilaçların kullanımı azalmış olsa da birçok gelişmekte olan ülke sağlık hizmetlerinin ana kaynağı olarak hala geleneksel tıbbi kullanmaya devam etmektedir (Ait Abderrahim vd., 2019). Kronik yara tedavisinin ekonomik yükü ve antibiyotiklere dirençli bakteriyel enfeksiyonların artışı da yara iyileşmesinde doğal tedavilerin kullanımına yönelimi ve bu konudaki araştırmaları artırmıştır (Oliveira vd., 2024).

Ancak, son zamanlarda doğal ürün terimi genellikle bitkiler veya bitkisel ürünler ile ilişkilendirilmiştir. Bitkiler, doğal ürünlerin keşfi ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır ve birçok terapötik uygulamada kullanılmaktadır (Sut vd., 2023). Bu kapsamda, tıbbi bitkiler diğer doğal kaynaklar arasında öne çıkmaktadır.

1.4.1. Tıbbi Bitkiler ve Yara Tedavisi

Bitkisel tedaviler, eski çağlardan beri yara iyileşmesi ve yara bakımı için geleneksel tıpta kullanılan ilk etkili terapötikler olmuştur. Bitkilerin yara iyileşmesi ve iyileşme sürecinin hızlandırılması üzerinde etkili olabilecek çok sayıda metabolit içermesi, geçmişte olduğu gibi günümüzde de tıbbi bitki içeren yara örtülerine olan ilgiyi artırmıştır (Herman ve Herman, 2023; Kepekçi vd., 2021; Mutlu vd., 2022).

Bitkilerde yer alan flavonoidler, alkaloidler, uçucu yağlar, tanenler, terpenoidler, saponinler, yağ asitleri, kinonlar ve fenoller gibi fitokimyasallar, antimikrobiyal, antienflamatuar, antioksidan etkilerinin yanı sıra kolajen sentezini destekleme, epitelizasyonu hızlandırma, hücre proliferasyonu ve anjiyogenezi teşvik etme gibi çeşitli biyolojik aktiviteleriyle yara iyileşme sürecinin farklı aşamalarında etkili olabilmektedir (Herman ve Herman, 2023; Kepekçi vd., 2021; Oliveira vd., 2024). Özellikle serbest radikalleri temizleme ve bakterisidal etki gösterme kapasiteleri, proliferatif aşamadaki yaraların tedavisinde kritik öneme sahiptir. Reaktif oksijen türleri (ROS; Reactive oxygen species), hücresel membranlar, DNA, proteinler ve lipitlerde zarar meydana getirerek ciddi doku hasarına ve hatta neoplastik dönüşüme yol açar. Bu nedenle, kronik yaraların iyileşmesi için antioksidan özelliklere sahip fitokimyasalların kullanımı da önemlidir. Yaraları enfekte eden patojenlerin iltihaplanmaya neden olduğu ve bu durumun yara iyileşme sürecini geciktirdiği de dikkat çekici bir gerçektir. Fitokimyasalların bu süreçteki olumlu etkileri, enfekte yaraların yönetimi ve iyileşme sürecinde önemli bir avantaj sunmaktadır. Kronik yaralarda, yara bölgesinde biriken yüksek düzeyde enflamatuvar hücre kaynaklı proteinazlar, ECM'nin bozulmasını artırmaktadır. Bu proteinazlar ayrıca, fibroblastların fonksiyonunda etkili olan sitokinler ve büyüme faktörlerini

bozarak fibroblastların ECM salgılama kapasitelerini dolaylı olarak etkilemekte ve iyileşme sürecinin uzamasına neden olmaktadır. Bu noktada, bitki metabolitlerinin antienflamatuvar aktivitesi ile enflamasyonun kontrol altına alınması, kronik yaraların iyileşmesi için önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Tanenlerin yara iyileşmesindeki etki mekanizmasının, proliferatif aşamada anjiyogenez, kollajen birikimi, granülasyon dokusu oluşumu, epitelizasyon ve yara kasılması gibi süreçlerle gerçekleştiği belirtilmiştir (Kepekçi vd., 2021). Bu etkiler, tanenlerin güçlü antioksidan ve antibakteriyel aktivitelerinin sinerjik etkilerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, tanenlerin astenjan özelliklerinin de yara iyileşme aktivitesine önemli bir katkı sağladığı rapor edilmiştir. Esansiyel yağlar, bitkiler tarafından biyosentezlenen monoterpenler ve seskiterpenler gibi düşük moleküler ağırlıklı uçucu metabolitlerden oluşan geniş bir ikincil metabolit grubudur. Çeşitli yara iyileşmesi çalışmalarında kekik yağı (timol ve karvakrol), tarçın yağı (sinnamaldehit), çay ağacı yağı, karanfil yağı, sandal ağacı yağı, lavanta yağı gibi esansiyel yağların yara iyileştirici potansiyeli gösterilmektedir. Esansiyel yağların güçlü antimikrobiyal, antioksidan ve antienflamatuvar aktiviteleri, yara iyileşme süreçlerini destekleyerek bu malzemelerin etkinliğini artırmaktadır. Flavonoidler, astenjan ve antimikrobiyal özellikleri sayesinde yara kapanmasını destekleyerek ve epitelizasyon oranını artırarak yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkiler. Ayrıca, flavonoidlerin serbest radikal temizleyici aktivitesi, lipid peroksidasyonunu azaltarak hücre nekrozunun başlamasını önleyebilir veya yavaşlatabilir, böylece yara iyileşmesini destekler (Al-Sheerazee vd., 2024; Fraj vd., 2019; Herman ve Herman, 2023; Oliveira vd., 2024; Rahman vd., 2020)..

Acalypha indica, *Achillea millefolium*, *Aloe vera*, *Arrabidaea chica*, *Azadirachta indica*, *Betula utilis*, *Calendula officinalis*, *Centella asiatica*, *Curcuma longa*, *Echinacea purpurea*, *Gymnema sylvestre*, *Hypericum perforatum*, *Matricaria chamomilla* ve *Satureja cuneifolia* gibi birçok bitkinin ekstresi, çeşitli doğal veya sentetik polimerlerle formüle edilerek yara iyileşmesi çalışmalarında kullanılmıştır (Canpolat vd., 2021; Guleken vd., 2021; Herman ve Herman, 2023; Ilhan vd., 2020; Ishfaq vd., 2023; Kaya ve Doğan, 2022; Liu vd., 2023). Bitki ekstresi yüklü yara örtülerinin yara iyileştirici aktivitelerinin temel nedeni bu bitki özlerinde bulunan fenolik asitler, flavonoidler, hiperisin, psödohiperisin, uçucu yağlar, terpenoidler, seskiterpenler, kumarinler, saponinler ve diğer polifenoller gibi bitkisel ürünlerin aktif bileşenlerinin tekli ya da sinerjik etkilerinden kaynaklandığı bildirilmektedir.

Mevcut veriler, bitki kaynaklı yara örtülerinin yara yönetiminde büyük bir potansiyel taşıdığını göstermesine rağmen, maliyet, tekrarlanabilirlik ve üretim kapasitesi gibi bazı

sınırlamalar bulunmaktadır. Ayrıca, yara örtülerinin üretiminde kullanılan çeşitli bitkisel metabolitler, belirli hassasiyetlere sahip bireylerde alerjik reaksiyon riskini de beraberinde getirebilir. Bu anlamda, bitkisel ekstre yüklü yara örtülerinin yalnızca alerjik etki açısından değil, aynı zamanda farklı ürün partilerinde tekrarlanabilirliğini sağlamak için kapsamlı kimyasal ve toksikolojik analizlere tabi tutulması gerekmektedir. Bitki materyallerinin kökeninin, bu materyallerin özelliklerini etkileyebileceği ve farklı bölgelerde yetişen aynı bitki türlerinin, partiler arasında değişikliklere yol açabilecek şekilde, farklı fiziksel ve biyolojik aktivitelere sahip biyomateriyaller üretebileceği bilinmektedir. Bu durum, bitkisel etkin madde içeren yara örtülerinin standardizasyonu ve güvenliği açısından dikkate alınması gereken önemli bir faktördür. Bazı bitki biyoaktif moleküllerinin miktarının ticari üretim için yeterli olamaması ve kaliteli malzemelerin elde edilmesini sağlamak için kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin doğruluğunun teyit edilmesi gerekmektedir. Bitki ekstraktlarında bulunan fitokimyasalların kimliği ve miktarının belirlenmesi, ayrıca yaraların yönetimi için yeni yara örtüsü formülasyonları geliştirmek amacıyla ekstre standardizasyonunun sağlanması ve biyoaktif bileşiklerin toksik olmayan dozlarının belirlenmesi için çok sayıda çalışma yapılması gereklidir (Herman ve Herman, 2023; Kepekçi vd., 2021). Bunun dışında, bitkisel ürünlerin aktif bileşenlerinin biyoyararlanımındaki sınırlamalar arasında düşük çözünürlük, vücut sıvılarının pH'sına bağlı düşük stabilite, bağırsak mikroflorasının etkisiyle yetersiz metabolizma, bağırsak duvarından düşük emilim, zayıf aktif geri taşıma mekanizması ve ilk geçiş metabolik etkileri gibi unsurlar yer almakta ve bu durum klinik çalışmaların başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olmaktadır. Bu kapsamda bitkisel kaynaklı ilaçlar için aktif bileşenlerin çözünürlüğünü, stabilitesini, biyoyararlanımını ve gastrointestinal geçirgenliğini artırmak için ilaç taşıyıcı sistemler gibi yenilikçi farmasötik sistemler ile formüle edilmeleri gerekmektedir (Rahman vd., 2020).

Tüm bu sınırlamalara rağmen, biyoyuumluluk, verimlilik ve zengin fitokimyasal içerikleri gibi üstün özellikleri nedeniyle genellikle sentetik alternatiflere göre bitkisel kaynaklı biyomalzemeler avantajlıdır. Yara iyileşme sürecinde antimikrobiyal, antienflamatuvar ve antioksidan aktiviteler gibi çeşitli biyoaktiviteler sergileyen bu materyaller, yara örtüsü çalışmalarında bitki biyoaktif moleküllerine olan ilginin artmasını açıklamaktadır. Bu alandaki çalışmalar, tamamen biyoaktif, biyolojik olarak parçalanabilir ve sürdürülebilir yara örtülerinin klinik uygulamalara kazandırılması amacıyla, yara örtüsü malzemelerine katkı maddesi olarak saflaştırılmış bitki metabolitlerinin uygulanmasına odaklanmaktadır. Böylelikle hem etkili hem de çevre dostu yara örtüleri geliştirilmesi mümkün hale gelecektir (Kepekçi vd., 2021). Farmasötik teknolojiye hızlı gelişmeler,

bitkisel ürünlerin aktif bileşenleri ile birleştirilmiş yeni nesil yara örtülerinin geliştirilmesine önemli katkılarda bulunmuştur. Özellikle, bitki ekstraktları veya bitkisel molekülleri içeren nanolifler, hidrojeller, köpükler, filmler, nanopartiküller ve bunların kompozitleri kullanılarak yeni nesil yara örtüsü biyomalzemeleri geliştirilmiştir (Guleken vd., 2021; Herman ve Herman, 2023; İlhan vd., 2020; Ishfaq vd., 2023; Karagül vd., 2024). Bu ilerlemeler, bitkisel ürünlerin aktif bileşenlerini içeren biyomalzemelerin yara yönetiminde etkin kullanımını artırarak daha inovatif ve etkili çözümler sunma potansiyeli taşımaktadır.

1.4.2. Antimikrobiyal Madde ve Yara Tedavisi

Bakteriyel enfeksiyon, yara iyileşmesinde karşılaşılan başlıca sorunlardan biridir. Yaralanmış deri, ilk olarak bütünlüğünü kaybeder ve mikroorganizmalar için aktif bir giriş noktası haline gelir. Bu nedenle, her yara potansiyel bir bakteriyel kontaminasyon riski taşır ve iyileşme sürecinin mümkün olan en kısa sürede başlaması, derinin bütünlüğünün yeniden sağlanması ve enfeksiyon riskinin azaltılması açısından önemlidir. Bakteriyel penetrasyon gerçekleştiğinde, yara bölgesi nem, sıcaklık ve beslenme açısından patojenlerin büyümesi için elverişli bir ortam sunar. Bakterilerin istilası sonrasında, bakteriler farklı mekanizmalarla yara iyileşmesini geciktirebilir. Bakteriler, dokunun besin ve oksijenini tüketir ve endotoksin üretirler. Bu durum, yara bölgesinin genişlemesine, hipoksiye, damar tıkanıklığına ve sonunda lokal yara bölgesinde doku ölümüne yol açabilir. Yara mikrobiyolojisinin kontaminasyondan enfeksiyona kadar farklı aşamaları bulunmaktadır. Düşük düzeyde bakteriyel kontaminasyonun, olumlu enflamatuvar evreleri tetiklediği ve artan kan akışı ile ilişkili olarak yara iyileşmesini desteklediği bilinmektedir. Ancak, kritik bakteriyel kolonizasyon ve enfeksiyonlar, yara iyileşmesinde gecikmelere ve hatta bakteriyel yükün ciddiyetine bağlı olarak hayatı tehdit eden sepsis veya çoklu organ yetmezliğine neden olabilir. Yaralarda enfeksiyonun erken evresinde genellikle *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) ve *Streptococcus pyogenes* gibi gram-pozitif bakteriler bulunurken, yaranın ilerleyen aşamalarında gram-negatif bakteriler ortaya çıkar. Yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 14 milyon insan, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından etkilenmekte ve bu durum hem yaşam kalitesinde düşüşe hem de ekonomik bir yükün artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle ideal bir yara örtüsünden beklenen özelliklerden biri de mikrobiyal penetrasyonunun engellenmesidir (Bal-Ozturk vd., 2021).

Günümüzde, mikrobiyal enfeksiyon olmadan yeterli yara iyileşmesini sağlamak için, antimikrobiyal etki gösteren ya da antimikrobiyal ajanlarla birleştirilmiş hidrojel, film, sünger

veya nanolif yapıdaki çeşitli yara örtüsü materyalleri geliştirilmiştir (Azad vd., 2004; Chen vd., 2025; Daristotle vd., 2020; Egozi vd., 2015; Elsner vd., 2011; Hurler vd., 2012; Ignatova vd., 2009; Jiang vd., 2016; Li vd., 2012; Monteiro vd., 2015; Muwaffak vd., 2017; Öztürk vd., 2006; Patil ve Wairkar, 2024; Sandri vd., 2013; Shi vd., 2019; Sohrabi vd., 2016; Tao vd., 2024). Bazı araştırma grupları, kitozan gibi doğal antimikrobiyal aktiviteye sahip polimerleri kullanarak yara örtüleri üretmeye odaklanmıştır (Azad vd., 2004; Ignatova vd., 2009). Ancak, bu materyallerin antibakteriyel kapasiteleri yara enfeksiyonlarını önlemek için yeterli bulunmamıştır. Bu nedenle, gentamisin, vankomisin ve neomisin gibi antibiyotikler; gümüş, altın ve çinko oksit gibi inorganik nanopartiküller, esansiyel yağlar veya bal, bor, kurkumin gibi çeşitli doğal kaynaklı antimikrobiyal ajanlar polimerik materyallere yüklenerek yara örtüsü hazırlanmıştır (Ait Abderrahim vd., 2019; Bal-Öztürk vd., 2024; Egozi vd., 2015; Muwaffak vd., 2017; Suntar vd., 2011). Tao vd. (2024) tarafından yapılan çalışmada, yüksek esnekliğe sahip kitozan bazlı kompozit filmler geliştirerek bu sistemin antibakteriyel ilaç salımı ve dolayısıyla yara iyileştirme süreçlerindeki potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmada, antimikrobiyal olarak tetrasiklin hidroklorür ve gümüş sülfadiazin kullanılmış; bu ajanlar, ilaç taşıyıcı olarak tasarlanan kitozan filmlere ilave edilmiştir. Bu yapı sayesinde, etkin maddelerin kontrollü salımı sağlanırken, aynı zamanda *Escherichia coli* (*E.coli*) ve *S.aureus* üzerinde anlamlı antimikrobiyal etkiler sağlanabildiği tespit edilmiştir. Patil ve Wairkar (2024) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, mupirosin yüklü film oluşturan kitozan sprey geliştirilmiş ve bu sistemin yara iyileşmesi ile antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiştir. Formülasyonun *E.coli* ve *S.aureus*'a karşı anlamlı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, *in vivo* yara iyileşme modeli kullanılarak yapılan hayvan çalışmalarında, 14. günde gözle görülür şekilde daha hızlı yara kapanması ve 21. günde normal seviyelere dönen TGF- β 1 seviyeleri tespit edilmiştir. Histopatolojik analizler de bu bulguları desteklemiş ve formülasyonun epitel rejenerasyonunu başarıyla desteklediği gözlenmiştir. Chen vd. (2025) tarafından yapılan çalışmada, bitkisel kaynaklı antimikrobiyal etkili berberin hidroklorür içeren jelatin-kitozan bazlı bir film tasarlanarak, antimikrobiyal, antioksidan ve elektriksel iletkenlik özellikleri üzerinden enfekte yara iyileşmesini destekleyici etkileri değerlendirilmiştir. *In vitro* testlerde formülasyon *E.coli* ve *S.aureus* üzerinde >%99 oranında antimikrobiyal etki göstermiştir. *In vivo* modellerde ise anjiyogenezi desteklediği, enflamasyonu azalttığı ve fibröz doku oluşumunu hızlandırarak yara iyileşmesini belirgin şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Film ayrıca sitotoksisite ve hemoliz testlerinden başarıyla geçmiş ve iyi biyouyumluluk göstermiştir. Bu bulgular, antimikrobiyal tedavinin yara tedavisinde potansiyel bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Tek başına bitkisel kaynaklı maddelerin ya da antimikrobiyallerin yeterli etkinlikte olamadığı tespit edilince bu tez çalışmasında yara iyileşmesinde bu iki etkenin birlikte kullanımına karar verilmiştir.

1.5. Yara Örtüsü Olarak Kullanılan Taşıyıcı Sistem ve Formülasyonlar

1.5.1. Filmler ve Hidrojeller

Hem yara bakımında beklenen özellikleri sağlayabilme kapasiteleri hem de film formundaki uygulama kolaylıkları nedeniyle genellikle poliüretandan üretilmiş elastik, sentetik ince filmler yara örtüsü uygulamalarında öne çıkmaktadır (Dhivya vd., 2015; Fonder vd., 2008; Kurtoğlu ve Karataş, 2009; Nguyen vd., 2023; Saghazadeh vd., 2018; Tiwari vd., 2023) ve ticari olarak Opsite™, Tegaderm™ ve Bioocclusive™ isimleriyle piyasada bulunmaktadır. Bu filmler, elastik ve şeffaf yapıları sayesinde uygulandıkları bölgede hareket özgürlüğü sağlamak ve yara örtüsünü çıkarmadan iyileşme sürecinin izlenebilmesine olanak tanımaktadır. Ancak, düşük eksüda absorpsiyonu nedeniyle yalnızca düşük eksüdalı yaralarda kullanılabilmesi ve biyodegradable olmamaları, çıkarıldıklarında yaranın zarar görme riskini artırmaları gibi dezavantajlar, bu ürünlerin kullanımı kısıtlayabilmektedir.

Bu sınırlamaları aşmak için alternatif bir yaklaşım olarak su ile büyük oranda şişebilen, çapraz bağlı üç boyutlu ağ yapısına sahip polimerik hidrojeller geliştirilmiştir (Alven vd., 2022; Boateng vd., 2008; Büke ve Kılıçarslan, 2025; Dhivya vd., 2015; Kamoun vd., 2017; Kumar vd., 2017; Kurtoğlu ve Karataş, 2009; Nguyen vd., 2023; Saghazadeh vd., 2018; Tiwari vd., 2023). Hidrojeller, hidrofilik yapılarıyla yaralara nem sağlayabilmekte, su absorbe edebilen porlu yapıları sayesinde eksüdayı uzaklaştırmakta ve gaz geçirgenlikleri ile yara mikro çevresinin oksijenlenmesini sağlamaktadır. Yumuşak ve elastik özellikleri sayesinde kolayca uygulanabilmekte ve çıkarıldıklarında hasara neden olmamaktadır. Hidrojeller, jel formunda doğrudan yara yüzeyine uygulanabildiği gibi, polimerik film halinde de kullanılabilir (Boateng vd., 2008; Fonder vd., 2008; Sannino vd., 2009). Jel formunda kullanıldığında genellikle ikincil bir gazlı bez sargısına ihtiyaç duyulması ve sık sık değiştirilme gereksinimi dezavantaj oluştururken, film formunda bu sorunların üstesinden gelinmektedir. Ayrıca, gazlı bezlere emdirilmiş hidrojel formülasyonları ile geleneksel yara örtüleriyle kombine kullanımları da bulunmaktadır (Saghazadeh vd., 2018).

Film şeklindeki hidrojel yara örtüleri, kullanılan polimerik materyallere göre farklı isimlerle anılmaktadır. Hidrofilik kolloidal polimerlerin yanı sıra elastomer ve adeziv bileşenler içeren filmler hidrokolloidler olarak adlandırılır. Bu yapıların mekanik dayanıklılığı yüksek olsa da su buharı geçirgenlikleri daha düşüktür (Boateng vd., 2008; Dhivya vd., 2015; Fonder vd., 2008; Saghazadeh vd., 2018). Bir diğer hidrojel örneği aljinalardır. Aljinat, mannuronik ve guluronik asit birimlerinden oluşan biyolojik olarak parçalanabilen doğal bir polisakkarittir. Kalsiyum iyonu gibi +2 değerlikli katyonlarla fiziksel olarak çapraz bağlanarak hidrojel oluşturur. Hemostatik özellikleri nedeniyle küçük çaplı kanamaların kontrolünde kullanılır ve yara iyileşmesini destekleyici biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Boateng vd., 2008; Büke ve Kılıçarslan, 2025; Dhivya vd., 2015; Fonder vd., 2008; Kurtoğlu ve Karataş, 2009; Nguyen vd., 2023; Saghazadeh vd., 2018). Eğer hidrojel karboksimetil selüloz (CMC; Carboxymethyl Cellulose) liflerinden oluşuyorsa hidrofiber olarak adlandırılır ve yapısal olarak aljinalara benzer özelliklere sahiptir (Richetta vd., 2011).

Hidrojel yara örtüleri için kullanılan diğer polimerler arasında kitozan, soy proteini, polivinil alkol (PVA), karbopol, jelatin, kolajen, hidroksi etil selüloz (HEC; Hydroxyethyl Cellulose), hidroksi propil metilselüloz, polivinil pirolidon (PVP), polikaprolakton (PCL; Polycaprolactone), kondroitin sülfat, glikozaminoglikanlar, fibrin, dekstran ve polimetil metakrilatlar (PMMA) gibi pek çok doğal ve sentetik polimer yer almaktadır (Büke ve Kılıçarslan, 2025; Chen vd., 2025; Gobi vd., 2021; Kamoun vd., 2017; Patil ve Wairkar, 2024; Saghazadeh vd., 2018; Tao vd., 2024). Bu gelişmiş materyallerle hazırlanan hidrojeller, nem kontrolü, enfeksiyon önleme ve iyileşmeyi hızlandırma gibi özellikleriyle modern yara bakımında sıklıkla tercih edilmektedir. Ticari ürünler olarak geniş bir yelpazede kullanıcıya sunulmakta ve teknolojinin de gelişmesiyle birlikte yara bakımı alanında giderek daha fazla kullanılmaktadır (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Ticari ürün haline gelmiş film ve hidrojel yara örtüleri (Büke ve Kılıçarslan, 2025)

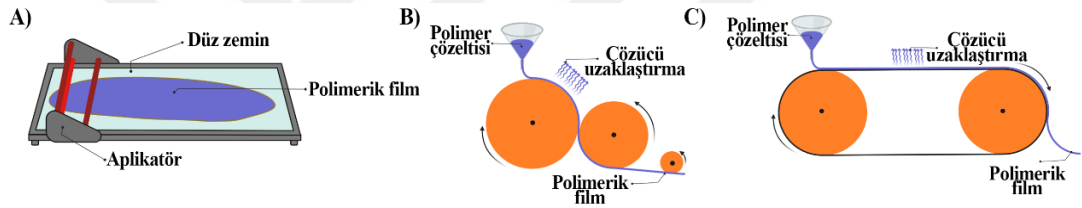
Ürün	Şirket	Polimer	Açıklama
Bioclusive™	Johnson & Johnson	Poliüretan	Film
Opsite™ Flexigrid	Smith & Nephew	Poliüretan	Film
Tegaderm™	3M Health Care	Poliüretan	Film
Intrasite™	Smith&Nephew	Modifiye CMC	Jel hidrojel
Nu-gel™	KCI Medical	Sodyum aljinat	Jel hidrojel
Aquaform™	Aspen Medical	Modifiye nişasta	Jel hidrojel
Purilon™	Coloplast	Aljinat	Jel hidrojel
Restore® Hydrogel	Hollister	Aljinat	Jel hidrojel
Geliperm®	Geistlich Sons	PMMA'lar	Jel ve film hidrojel
Sorbsan™	BerTec	Kalsiyum aljinat	Gazlı beze emdirilmiş
Kaltostat™	ConvaTec	Sodyum-kalsiyum aljinat	Gazlı beze emdirilmiş
Algisite™ M	Smith&Nephew	Kalsiyum aljinat	Gazlı beze emdirilmiş
Tegagel™	3M Health Care	Kalsiyum aljinat	Gazlı beze emdirilmiş
Aquacel™	ConvaTec	NaCMC	Gazlı bez emdirilmiş
Granuflex™	ConvaTec	CMC, jelatin, pektin	Poliüretan filme yapışmış hidrokolloid
Comfeel™	Coloplast	NaCMC, HEC, Kalsiyum aljinat	Poliüretan filme yapışmış hidrokolloid
Tegasorb™	3M Health Care	Poliizobütilen	Poliüretan filme yapışmış hidrokolloid

Polimerik filmler, çözücü dökme, eriyik presleme, eriyik ekstrüzyon, kabarcık üfleme, üç boyutlu (3B) baskı ve nanolif teknolojilerini içeren çeşitli yöntemlerle hazırlanabilmektedir. Çözücü dökme yöntemi, düşük maliyetli ve ölçeklenebilir bir işlem olması nedeniyle en yaygın tercih edilen yöntemdir (Bal-Öztürk vd., 2024; Büke ve Kılıçarslan, 2025; Goyanes vd., 2016; Hafezi vd., 2019; Jayram vd., 2025; Oliveira vd., 2024). Son yıllarda 3B baskı teknolojileri, daha karmaşık yapıların elde edilmesine imkan vermesi ve kişiye özel tasarımlar oluşturma imkanı sunması nedeniyle öne çıkan yöntemlerdendir. Çalışmamızda kullanılmış olan film üretim yöntemleri özellikle önformülasyon aşamasında film oluşumunu tespit etmek için kullanılan çözücü dökme yöntemi ve 3B baskı yöntemi olduğu için sadece bu yöntemlerle ilgili incelemelerimiz özetlenecektir.

1.5.1.1. Çözücü Dökme Yöntemi

Çözücü dökme yöntemi, düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olması yönüyle polimerik filmlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, temel olarak polimerik bir çözeltinin veya jelin düz ve yapışkan olmayan bir zemine dökülerek kurutulmasını içerir. Kurutma işlemi sonrasında çözücü buharlaşır ve kuru filmler yüzeyden çıkarılarak elde edilir (Büke ve Kılıçarslan, 2025; Devi ve Dutta, 2017; Egozi vd., 2015;

Goyanes vd., 2016; Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Hafezi vd., 2019; Kariduraganavar vd., 2014; Kilicarslan vd., 2018; Wathoni vd., 2016). Çözücü dökme işlemi sırasında, homojen bir karışım sağlamak amacıyla genellikle oda sıcaklığında veya biraz üzerinde buharlaşabilen çözücüler tercih edilir. Ayrıca, çözücünün yavaş buharlaşması, filmde kabarcık veya yarı kristal çökelti oluşumlarını önlemek ve kaliteli filmler elde etmek için önemlidir. Kaynama noktası 60-100°C arasında olan çözücülerin kullanımı, film kalitesini artırmak açısından daha uygundur. Küçük ölçekli uygulamalarda homojen kalınlıkta filmler, yalnızca polimer çözeltisinin düz bir yüzeye dökülmesiyle hazırlanabilirken, daha büyük ölçeklerde bu yöntem, otomatik film makineleri gibi endüstriyel sistemlere kolayca uyarlanabilmektedir. Katmanlar halinde film hazırlama olanağı sunması ve laboratuvar ölçeğinden endüstriyel ölçeğe kadar ölçeklenebilir olması, çözücü dökme yöntemini oldukça avantajlı hale getirmektedir (Büke ve Kılıçarslan, 2025; Gomes Neto vd., 2019; Kariduraganavar vd., 2014; Khan vd., 2016). Şekil 1.3.'te, bu yöntemin farklı ölçeklerde uygulanmasını şematize eden bir örnek gösterilmektedir.



Şekil 1.3. Laboratuvar koşullarında (A) ve daha büyük ölçeklerde (B, C) çözücü dökme yöntemiyle polimerik film hazırlanışının şematik gösterimi (Büke ve Kılıçarslan, 2025)

Literatürde yer alan çalışmaların çoğunda, daha yeni teknolojilerin gelişmesine rağmen daha önce belirtilen avantajları nedeniyle çözücü dökme yönteminin yara örtüsü çalışmalarında hala tercih edildiği görülmektedir (Ahmady vd., 2022; Al-Sheerazee vd., 2024; Aydın ve Zorlu, 2022; Bal-Öztürk vd., 2024; Ceylan, 2021; Colobatiu vd., 2019; Escarcega-Galaz vd., 2018; Gunes vd., 2020; Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Jayram vd., 2025; Karagül vd., 2024; Oliveira vd., 2024).

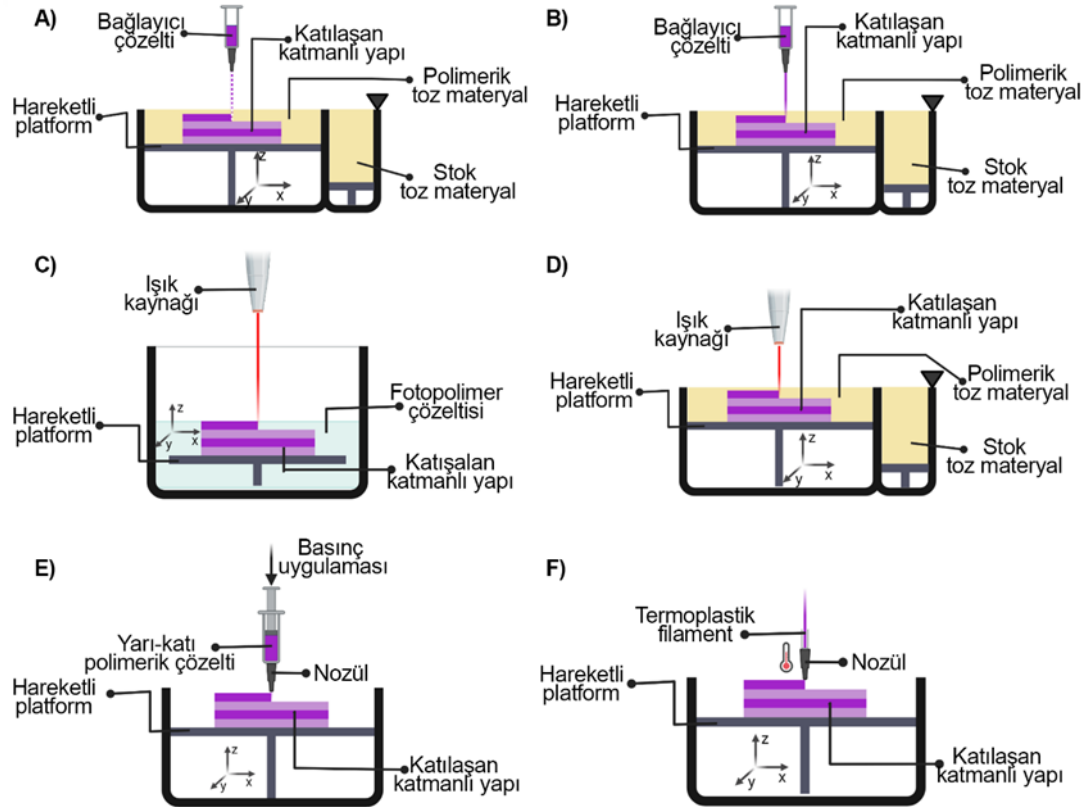
1.5.1.2. Üç Boyutlu (3B) Baskı Teknolojileri

Günümüzde teknolojik yeniliklerle birlikte, geleneksel ilaç üretim yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen teknolojilere yönelim artmıştır. Bu yeni teknolojilerden biri olan üç boyutlu (3B) baskı yöntemi, özellikle kişiselleştirilmiş ilaç şekillerinin üretiminde umut vaat etmektedir. Geleneksel yöntemlerle üretilmesi mümkün olmayan bireysel ihtiyaçlara yönelik ilaç şekillerinin 3B baskı ile üretilebilmesi, farmasötik alanda yeni bir çıkış açmıştır.

Özellikle, mürekkep püskürtme esaslı baskı (IJP; inkjet printing) yöntemiyle üretilen ve Spritam® adıyla bilinen tabletler, 2015 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA; Food and Drug Administration) tarafından onaylanarak, farmasötik alanda 3B baskı teknolojisine olan ilgiyi büyük ölçüde artırmıştır. Literatürde, 3B baskı teknolojisi ile farklı ilaç şekillerinin başarıyla üretildiği belirtilmektedir. 3B baskı, önceden tasarlanmış 3B objelerin Bilgisayar Destekli Tasarım (CAD; Computer-Aided Design) yardımıyla malzemelerin katmanlar halinde üst üste biriktirilerek üretilmesi esasına dayanmaktadır (Abdelhamid vd., 2024; Bishnoi vd., 2024; Büke ve Kılıçarslan, 2024; Büke ve Kılıçarslan, 2025; Cardoso ve Araújo, 2024; Gültekin vd., 2019; Gültekin vd., 2022; Huanbutta vd., 2023; Ianno vd., 2024; Kılıçarslan vd., 2023; Kulkarni vd., 2024; Negiz ve İlbasmış Tamer, 2024; Oliveira vd., 2021; Oto ve Yılgör Huri, 2024; Pavan Kalyan vd., 2023; Vlachou vd., 2025; Yılgör Huri ve Oto, 2022). Farmasötik endüstride, 3B baskının en önemli avantajlarından biri, tedavinin etkinliğini ve güvenliğini artırmak amacıyla hastaların bireysel gereksinimlerine göre uyarlanmış ürünlerin üretimini mümkün hale getirmesidir. Geleneksel ilaç şekillerinin üretiminde benimsenen “herkes için aynı” yaklaşımı, büyük ölçekli seriler halinde, sınırlı doz aralığında kitlesel üretime dayanır. Ancak bu yaklaşım, hastalar arasındaki bireysel farklılıkları göz ardı ederek, tedaviye verilen yanıtlarda önemli varyasyonlara, beklenen etkinin azalmasına veya toksisite riskine yol açabilmektedir (Alhnan vd., 2016; Carou-Senra vd., 2024; Ianno vd., 2024; Milliken vd., 2024). Hastaya özgü doz, ilaç şekli ve tasarımı dikkate alınarak, bireyin yaş, kilo, cinsiyet, eşlik eden hastalıklar, ilaç kullanımı, fizyoloji, genetik yapı, metabolizma, yaşam tarzı ve rutinleri gibi tüm hasta özellikleri göz önünde bulundurularak, bireyin ihtiyacına en uygun tedaviyi doğru dozda ve doğru zamanda sağlayan kişiselleştirilmiş ilaçların üretiminde 3B baskı teknolojilerinin kullanımı önemli bir yenilik ve büyük bir gelişme olarak kabul edilmektedir (Beer vd., 2021; Büke ve Kılıçarslan, 2024). Ayrıca, bu yöntemle geleneksel üretim teknikleriyle hazırlanması zor olan karmaşık yapı ve geometrilere sahip yenilikçi ilaç salım sistemleri geliştirilebilir. Bunun yanında, kitlesel üretim yerine talep odaklı üretim yapılabilmesi, maliyetlerin azaltılmasını ve üretim sürecinin verimliliğinin artırılmasını sağlamaktadır.

Farmasötik ilaç şekillerinin üretiminde, 3B baskı teknolojileri farklı kaynaklarda farklı şekillerde sınıflandırılmakla beraber, temelde üç farklı mekanizma ile uygulanabilmektedir (Şekil 1.4.) (Bishnoi vd., 2024; Boateng, 2024; Büke ve Kılıçarslan, 2025; Goole ve Amighi, 2016; Kılıçarslan ve Gencel, 2020; Kılıçarslan vd., 2023; Negiz ve İlbasmış Tamer, 2024). Mürekkep püskürtme sistemleri (IJP) bir zemin üzerine çözücü olarak bağlayıcı çözeltinin sürekli (Şekil 1.4.B) veya isteğe bağlı (Şekil 1.4.A) dijital kontrollü olarak küçük sıvı

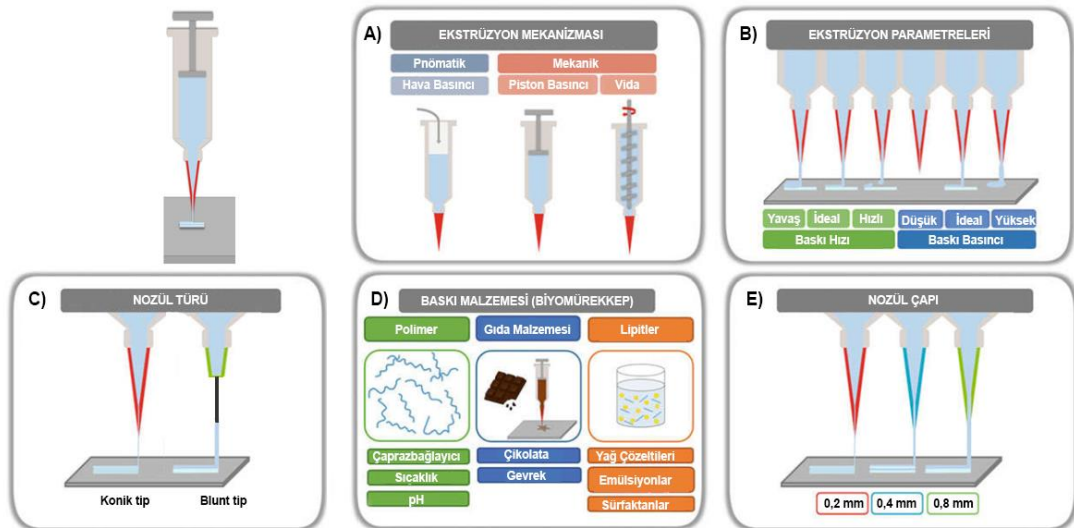
damlaların tabakalı bir şekilde birikmesi esasına dayanır. Ekstrüzyon esaslı sistemler, polimer ve diğer bileşenlerin 3B baskıdan önce karıştırılarak hazırlanan viskoz yarı katı veya erimiş katı karışımlarının bir nozül başlığından ekstrüde edilmesiyle doğrudan baskı yapılan sistemlerdir (Şekil 1.4.E-F). Herhangi bir ısıtma işlemi olmadan viskoz bir yarı katının ekstrüde edilmesiyle (SSE; Semi Solid Extrusion) (Şekil 1.4.E) veya termoplastik bir polimerin yüksek sıcaklıkta eritilerek ekstrüzyonu (FDM; Eriyik Yığılma Modelleme) ile baskı yapılabilir (Şekil 1.4.F). Lazer esaslı baskı sistemleri ise polimerik materyallerin sistemde yer alan ışık kaynağıyla etkileşimine dayanan bir baskı yöntemidir (Şekil 1.4.C-D). Fotobaşlatıcı içeren polimerlerin fotopolimerizasyonu (SLA; Stereolitografi) (Şekil 1.4.C) veya polimerik toz materyallerin sıvılaştırarak kaynaşması ve katılaşması (SLS; Seçici lazer sinterleme) ile baskı yapılabilir (Şekil 1.4.D).



Şekil 1.4. Eczacılık alanında kullanılan 3B baskı teknolojilerinin şematik gösterimi; A) İsteğe bağlı damlacık B) Sürekli mürekkep püskürtmeli inkjet, C) SLA, D) SLS, E) SSE, F) FDM (Büke ve Kılıçarslan, 2025).

Son yıllarda farmasötik ürünlerin geliştirilmesinde en çok araştırılan 3B baskı teknolojileri arasında, malzeme ekstrüzyonuna dayalı tekniklerden biri olan SSE öne çıkmaktadır. SSE tekniği kullanılarak ilaç şekillerinin üretimine dair ilk çalışma Khaled vd. (2014) tarafından bildirildikten sonra, bu yöntemin kişiselleştirilmiş ilaç üretimindeki

avantajlarını ortaya koyan çok sayıda araştırma yayımlanmış ve literatürdeki bilimsel yayınların sayısı hızla artmıştır. SSE yöntemi, robocasting, soğuk ekstrüzyon esaslı baskı, hidrojel-forming ekstrüzyon, biyobaskı, doğrudan mürekkep baskı, sıcak eriyik pnömatik ekstrüzyon, mikro-ekstrüzyon ve basınç destekli mikrosiringa (PAM; Pressure-assisted microsyringe) gibi çeşitli isimlerle de literatürde yer almaktadır. SSE, yarı-katı formülasyonların baskı mürekkebi olarak kullanıldığı bir 3B baskı tekniğidir. Bu formülasyonlar genellikle tek kullanımlık bir şırıngaya yerleştirilir ve reçeteye veya baskı ihtiyacına bağlı olarak değişebilen çaplara ve tiplere sahip bir nozül aracılığıyla ekstrüde edilir. Ekstrüzyon mekanizması pnömatik veya mekanik sistemler şeklinde olabilir (Şekil 1.5.A). Şırıngaya uygulanan basınç sayesinde materyal, baskı tablası üzerine katman katman bırakılır ve istenilen ilaç şeklinin boyutu ve geometrisi elde edilene kadar bu işlem devam eder. Şu ana kadar yapılan en çok su bazlı formülasyonların çalışıldığı ve yapının korunmasını sağlamak amacıyla bir katılaştırma adımı gerektiği görülmektedir. SSE'nin en önemli avantajlarından biri, oda sıcaklığında çalışılabilmesidir. Bu sayede, ısıya duyarlı etkin maddeler ile çalışmak mümkün hale gelir. Ayrıca, bu yöntemin ilaç üretiminde sunduğu diğer bir avantaj da, etkin maddenin doğrudan jel, krem veya macun formundaki matris içine kolayca dahil edilebilmesidir. Bu özellik, dozun kişiselleştirilmesini ve salım profilinin istenen şekilde ayarlanmasını kolaylaştırır. Ancak, SSE yöntemi mürekkep hazırlama ve baskı işlemi açısından kolay gibi görünse de baskı kalitesini etkileyen bazı kritik hususlar mevcuttur. (Funk vd., 2023; Oliveira vd., 2021; Seoane-Viano vd., 2021).



Şekil 1.5. SSE 3B baskı tekniğinin şematik gösterimi, ekstrüzyon işlemiyle ilgili kritik parametreler (ekstrüzyon mekanizmaları, parametreler, nozül türü ve çapı) ve hammadde türleri ((Funk vd., 2023)'den uyarlanmıştır)

Yazıcı kafasının hareket hızı kritik bir parametredir (Şekil 1.5.B). Çok hızlı hareket, malzemenin tablaya düzgün yapışmamasına, çok yavaş hareket ise aynı noktaya fazla materyal birikmesine neden olabilir. Bu da katman kalınlığı ve ürün boyutlarında sapmalara yol açar. Baskı hızı, mürekkebin akışkanlığı ile uyumlu olacak şekilde optimize edilmelidir. Baskı sırasında uygulanan basınç, özellikle pnömatik sistemlerde, nozül ucundan çıkan materyal miktarını belirler. Baskı basıncının manuel olarak ayarlanması, deneyimler arası değişkenliğe yol açabilir. İdeal durumda, baskı basıncının yazılım üzerinden hassas ve sabit bir değer olarak ayarlanması önerilmektedir. Başarılı bir baskı için en önemli adımlardan biri de, ilk katmanın düzgün şekilde yerleştirilmesidir. İlk katmanın yüzeye iyi tutunması, sonraki katmanların hizalı ve stabil bir şekilde birikmesini sağlar. Eğer ilk katmanda eksik veya hatalı yerleşim olursa, baskı süreci ilerledikçe yapı bozulur, katmanlar kayar ya da çökme oluşabilir. Nozül ile baskı tablası arasındaki mesafe, ekstrüde edilen mürekkepler düzgün şekilde yerleşmesini etkiler. Bu mesafe çok kısa olursa nozül tıkanabilir, mürekkep yayılabilir. Çok uzak olduğunda ise mürekkep havada sarkar, doğru yere temas etmeden şekli bozulur. Bazı yazıcılar bu ayarı otomatik kalibrasyon ile yaparken, bazı sistemlerde manuel kalibrasyon gerekir (Funk vd., 2023; Seoane-Viano vd., 2021).

SSE yönteminde baskı sürecinde baskı hızı ve baskı basıncı hem ürünün fiziksel özelliklerini hem de farmasötik performansını doğrudan etkilemektedir (Şekil 1.5.B). Bu nedenle, yazılım ayarlarından baskı başlığı hareketlerine, nozül çapından baskı hızına kadar her adım dikkatle optimize edilmelidir. Baskı süreci, genellikle CAD yazılımı ile başlar. Bu yazılımda oluşturulan 3B model, dilimleme (slicing) yazılımına aktarılır ve burada katmanlara ayrılır. Ardından, dolgu yoğunluğu (infill density), dolgu deseni (infill pattern), katman yüksekliği (layer height), baskı hızı, nozül hareket rotası gibi tüm parametreleri içeren Gcode adı verilen bir komut dosyası oluşturularak yazıcıya gönderilir. Bazı yazılımlar, birden fazla ilaç şeklinin aynı anda yazdırılmasını desteklese de nozülün tekrar eden hareketleri baskı yapılan yüzey üzerinde fiziksel deformasyonlara neden olabilir. Bu durum, doz birimleri arasında ağırlık ve içerik farklılıklarına yol açarak farmasötik kalite açısından ciddi riskler oluşturabilir. Bu nedenle, baskı sırası ve yönünün yazılım üzerinden kontrollü bir şekilde düzenlenebilmesi önemlidir. Dolgu deseni, baskı yapılan ürünün iç yapısını oluşturur ve çözünme süresi, salım profili ve mekanik dayanıklılık gibi parametreleri doğrudan etkiler. En yaygın desenler arasında doğrusal (rectilinear), ızgara (grid) ve dairesel (concentric) desenler yer alır. Dolgu yoğunluğu azaldıkça oluşan daha gözenekli yapı nedeniyle hızlı dağılma ve çözünme elde edilebilirken, artan dolgu yoğunluğu ile elde edilen yoğun yapı, yavaş çözünme ve yavaş salıma neden olabilir. Ayrıca, dolgu yoğunluğu doz birimindeki etkin madde

miktarını da etkileyebilir; daha düşük dolgu oranları, daha düşük etkin madde yükleme kapasitesine neden olabilir (Funk vd., 2023; Seoane-Viano vd., 2021; Vlachou vd., 2025).

SSE tekniği ile başarılı bir 3B baskı süreci elde edebilmek için, kullanılacak baskı mürekkebinin reolojik özelliklerinin uygunluğu son derece kritiktir. Mürekkebin formülasyonu sırasında seçilen polimerler, yardımcı maddeler ve etkin madde kadar (Şekil 1.5.D), bu karışımın viskozitesi, akış davranışı ve mekanik dayanıklılığı da nihai ürünün kalitesini doğrudan etkileyen parametreler arasında yer almaktadır. Her ne kadar SSE, formülasyon açısından esnek bir teknoloji olsa da uygun reolojik profile sahip bir yarı-katı sistemin elde edilmesi, baskı sürecinin başarısı açısından temel gerekliliktir. Baskı mürekkebinin viskozitesi, baskı sırasında mürekkebin nozül içerisinden dengeli ve kontrollü bir şekilde ekstrüde edilmesini sağlar. Çok düşük viskoziteye sahip mürekkepler, nozül ucundan damlama ya da düzensiz akış gibi kontrol dışı sonuçlara yol açarken, çok yüksek viskoziteye sahip sistemler ise nozülün tıkanmasına, ekstrüzyon güçlüğüne ve katmanların tutarsız bir şekilde yerleşmesine neden olabilir. Bu nedenle, formülasyonun viskozitesi, ekstrüzyon sırasında uygulanan basınca uygun olacak şekilde ayarlanmalı ve baskı öncesi reolojik karakterizasyon ile kontrol edilmelidir. Elviri vd. (2017b)'nın SSE sistemi kullanarak kitozan ile skafold üretimi sırasında konsantrasyon ve viskozite ölçümüne karşı basılabilirliğini karşılaştırdıkları çalışmada, sırasıyla 5400 ile 45000 cP aralığında artan viskoziteye sahip, %5 - 5,5 - 6 - 6,5 - 7 ve 7,5 a/h konsantrasyonda kitozan çözeltilerinin baskıya uygun olduğu bildirilmiştir. Kitozan dışında pek çok doğal ve sentetik polimerle 3B baskı çalışması başarıyla gerçekleştirilmiştir. SSE mürekkepleri genellikle kayma ile incelleme (shear-thinning) davranışı sergileyen non-Newtonian akışkanlar olarak tanımlanır. Bu davranış sayesinde, mürekkep baskı sırasında uygulanan kuvvetle akışkan hale gelirken, baskı sonrasında viskozitesini yeniden kazanarak yapı bütünlüğünü korur. Bu özellik, tiksotropik davranış ile desteklendiğinde, baskıdan sonra tabakalar arasında hızlı bir şekilde stabilizasyon sağlanır ve yapının çökmesi veya yayılması gibi istenmeyen deformasyonlar engellenir. Bazı SSE yazıcılarında, nozül ve tabla sıcaklığı ayarlanabilir olup, bu özellik termo-duyarlı mürekkepler için avantaj sağlamaktadır. Baskı sırasında yazıcı kafasının sıcaklığı artırılarak akış kolaylaştırılabilirken, yazıcı tablasının daha düşük sıcaklıkta tutulmasıyla baskı sonrası yapının hızla stabil hale gelmesi sağlanabilir. Bu strateji hem baskı doğruluğunu hem de katmanlar arası yapışmayı artıran etkili bir yöntemdir. Baskı tamamlandıktan sonra, ürünün yapısal bütünlüğünü koruyabilmesi ve farmasötik kalite kriterlerini karşılaması için çoğu zaman bir son işlem (post-processing) adımı gereklidir. Bu adımlar arasında kurutma, çapraz bağlama (crosslinking) veya fotokimyasal sertleştirme işlemleri yer almaktadır. Özellikle

biyobozunur polimerlerle çalışan sistemlerde, bu aşamalar ürünün mukavemeti, çözünürlüğü ve salım kinetiği gibi özelliklerini belirleyen kritik basamaklardır. Ancak bu işlemler sırasında etkin maddenin stabilitesi, fotodegradasyon riski veya çapraz bağlayıcıdan kaynaklı toksik yan ürün oluşumu gibi olumsuz etkiler de göz önünde bulundurulmalıdır (Funk vd., 2023; Seoane-Viano vd., 2021; Vlachou vd., 2025).

SSE 3B biyobaskı uygulamalarında, baskı kalitesini doğrudan etkileyen en önemli parametrelerden biri nozül geometrisidir (Şekil 1.5.C). Reina-Romo vd. (2021), konik ve blunt tip uçların karşılaştırıldığı çalışmalarında, konik uçların uç bölgesinde daha yüksek fakat lokalize bir maksimum kayma gerilimi oluşturduğunu, blunt tip uçların daha geniş bir alanda daha düşük fakat yaygın bir kayma gerilimi oluşturduğunu bildirmiştir. Chand vd. (2022)'nin çalışması, konik ve blunt tip uçlar için detaylı hesaplamalı akışkanlar dinamiği analizleri gerçekleştirmiştir. Ayrıca aynı nozül çapı ve basınç değerlerinde, konik tip uçların akış hızları daha yüksek bulunmuş ve baskı süresinin kısalması açısından avantajlı bulunmuştur. Öte yandan, blunt tip uçların dar hacimli ve hassas bölgelerde baskı yapılmasını kolaylaştırdığı, ayrıca pahalı biyomürekkeplerin kullanıldığı uygulamalarda malzeme israfını azaltıcı avantajlar sunduğu belirtilmiştir. Nozül çapı da, ekstrüde edilen filamentin kalınlığını belirler (Şekil 1.5.E). Daha küçük çaplar yüksek çözünürlük sağlar, ancak tıkanma riski daha yüksektir. Nozül geometrisinin konik yapıda olması, ekstrüzyon basıncını azaltarak daha akıcı bir baskı süreci sağlar. Ayrıca, kısa ve geniş iç çapa sahip nozullar, yarı-katı mürekkeplerin daha rahat akmasını destekler (Funk vd., 2023; Seoane-Viano vd., 2021). SSE ile geliştirilen ilaç şekilleri için yalnızca uygun formülasyon geliştirmek yeterli değildir, aynı zamanda baskı sürecine ait tüm parametrelerin sistematik biçimde optimize edilmesi gerekir. Bu optimizasyon, ilaç şeklinin homojenliğini, tekrar edilebilirliğini ve farmasötik kalitesini garanti altına alır.

Tüm bu yönetsel ve formülasyona ait parametreler optimize edildiğinde, doğal dokuyu taklit edebilen, yeterli mekanik ve biyolojik özelliklere sahip film ve hidrojel yara örtülerinin hazırlanmasında SSE 3B baskı sistemlerinin etkili bir şekilde kullanıldığı görülmektedir (Boateng vd., 2023; Dinh vd., 2024; Galvao Duarte vd., 2025; Hafezi vd., 2019; Ilhan vd., 2020; Intini vd., 2018; Karavasili vd., 2020; Khoshmaram vd., 2024; Lin vd., 2022; Long vd., 2019; Maver vd., 2018; Miguel vd., 2019; Sakai vd., 2024; Teoh vd., 2022; Vlachou vd., 2025; S. Wang vd., 2019). Hafezi vd. (2019), genipin ile çapraz bağlanmış kitozan filmleri SSE 3B baskı yöntemiyle hazırlamış ve yüksek şişme oranları ile biyoyuymululuk özelliklerinin yara bakımında kullanım için uygun olduğunu bildirmişlerdir. Boateng vd. (2023), epidermal

büyüme faktörü (EGF) ile yüklenmiş, genipin ile çapraz bağlanmış kitozan ya da kolajen kombinasyonlu filmleri SSE yöntemiyle 3B olarak üretmişlerdir. EGF salımı 72 saate kadar uzamış, filmler %90'dan fazla hücre canlılığı göstermiştir ve kronik yaralar için potansiyel taşıdığı bildirilmiştir. Ilhan vd. (2020), *Satureja cuneifolia* bitki ekstraktı içeren sodyum aljinat/PEG bazlı skafoldları SSE yöntemiyle 3B olarak basmışlardır. Skafoldlar, fibroblast hücrelerinde sitotoksik etki oluşturmamış ve antibakteriyel etkileriyle diyabetik yaralar için uygun bulunmuştur. Long vd. (2019), lidokain hidroklorür içeren kitozan-pektin bazlı hidrojel yara örtüsünü SSE yöntemiyle 3B olarak basmış, bu örtülerin yüksek şişme oranı ve nemli ortam sağlama potansiyelini raporlamıştır. Sakai vd. (2024), fenollenmiş kitozan ve kitozan nanofiber içeren mürekkeplerle, SSE 3B baskı yöntemiyle yara örtüleri üretmişlerdir. Bu yapılar, enflamasyon oluşturmada re-epitelizasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunu desteklemiştir. Khoshmaram vd. (2024), kurkumin yüklü nanopartikül içeren jelatin metakrilat ile deri doku mühendisliğinde kullanılabilir, hücre proliferasyonunu artıran ve mikrobiyal enfeksiyonları azaltan yara örtüsü çalışması bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada aljinat-kitozan hidrojellerinin manuka balı, *Aloe vera* jeli, okaliptüs esansiyel yağı gibi biyolojik olarak aktif bileşenler ile yara iyileşmesi için hem fiziksel hem de mekanik özellikleri açısından uygun olduğu gösterilmiştir (Karavasili vd., 2020). Bu çok yönlülüğü sayesinde SSE, yara örtüsü gibi kişiselleştirilmiş ilaçlar geliştirmek için güçlü bir araç haline gelmiştir. Tüm bu çalışmalar, 3B baskı sistemlerinin, biyolojik uyumluluk, etkin madde salımı ve doku taklidi açısından geleneksel yöntemlere göre önemli avantajlar sunduğunu ortaya koymaktadır.

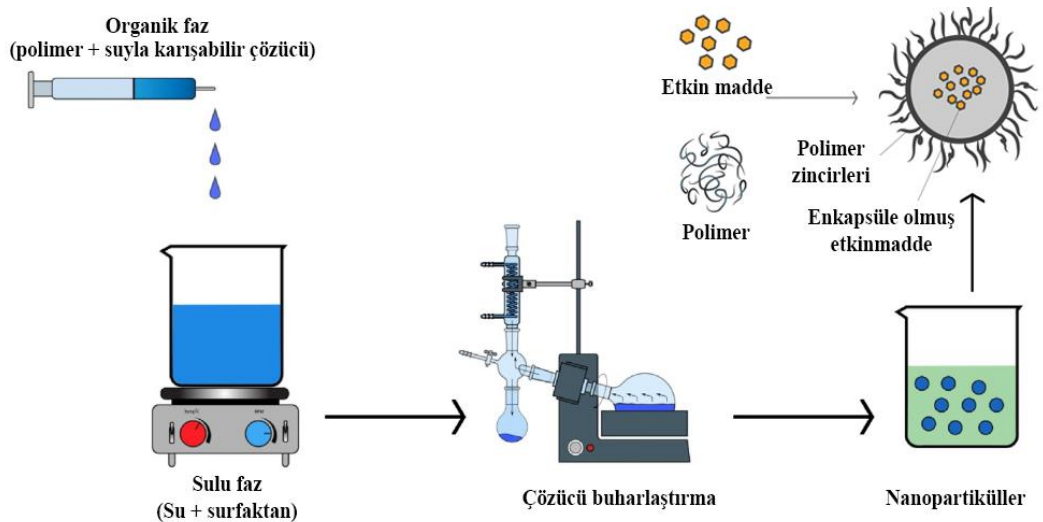
1.5.2. Partiküler Sistemler

Tez çalışmasında *H.perforatum*'un nanopartikülleri hazırlanarak hem ışık stabilitesi korunmuş hem de hiperisin salımı modifiye edilmiştir. Bu nedenle ilerleyen bölümde partiküler sistemler üzerine yaptığımız incelemeler özetlenmiştir.

Nano ve mikro ilaç taşıyıcı sistemler, katı partikülleri veya sıvı ya da gaz damlacıkları inert bir materyal ile dış çevreden izole eden, mikro ve nano boyutta partiküllerin enkapsülasyonu ile oluşan ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Grabnar ve Kristl, 2011; Jyothi vd., 2010; Karagül vd., 2024; Kurt ve Aslan, 2025; W. Wang vd., 2019). Nanotaşıyıcılar, duyarlı etkin maddeleri dış çevreden koruyarak stabilite sağlamaları, lipofilik etkin maddelerin çözünürlüğünü ve biyoyumluluğunu artırabilmeleri, polimerik matris aracılığıyla kontrollü salım yetenekleri ve hedeflendirilebilir özellikleriyle etkin maddelerin terapötik etkinliğini artırabilmeleri gibi nedenlerle üzerinde çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Yara iyileşmesini

ve deri yenilenmesini desteklemek amacıyla yara örtülerinden topikal etkin madde uygulamalarında da nanopartikül kullanımı büyük bir potansiyele sahiptir. Polimerik nano ve mikropartiküllerin yanı sıra lipozom, niozom ve lipit nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistem olarak yara örtüsü formülasyonlarında yer almaktadır (Ali vd., 2018; Dadashzadeh vd., 2019; Dharashivkar vd., 2015; Gainza vd., 2015; Hurler vd., 2012; Hurler ve Skalko-Basnet, 2012; Hurler vd., 2013; Karagül vd., 2024; Khoshmaram vd., 2024; Kurt ve Aslan, 2025; Li vd., 2012; Nunes vd., 2011; Nunes vd., 2016; Sandri vd., 2013; Sohrabi vd., 2016; Ulubayram vd., 2001).

Nano ve mikropartiküller, önceden şekillendirilmiş polimerlerden spontan olarak hazırlama yöntemleri (nanoçöktürme/nanopresipitasyon ve koaservasyon ile faz ayrımı, iyonik jelasyon) ve s/y veya y/s emülsifikasyon teknikleri (emülsiyon-çözücü difüzyon, emülsiyon-çözücü buharlaştırma, tuzla çöktürme) ile hazırlanabilirler (Grabnar ve Kristl, 2011). Özellikle lipofilik etkin maddelerin nano ve mikropartiküllere yüklenmesinde en çok tercih edilen yöntem, nanoçöktürme yöntemidir (Şekil 1.6.). Bu yöntem, suyla tamamen karışabilen organik çözücü (aseton, etanol, N-metil pirolidon, dimetil sülfoksit gibi) içinde hidrofobik polimer çözeltisi (bazen yağ da içeren) ile etkin maddenin dispersiyonu ve/veya çözünmesi, ardından sulu faz ile emülsifikasyonu ile nano/mikro boyutlu damlacıkların oluşumu ve çözücünün uzaklaştırılması ile partiküllerin oluşturulması esasına dayanır (Grabnar ve Kristl, 2011; Khayata vd., 2012; Martinez Rivas vd., 2017; Reis vd., 2006).



Şekil 1.6. Nanoçöktürme yöntemiyle nano ve mikropartikül üretim yönteminin şematik gösterimi (Martinez Rivas vd., 2017)

Nanopresipitasyon yöntemi, Fessi vd. (1989) tarafından 1989 yılında patentlenmiştir. Geliştirilmesinden sonra, çoğunlukla hidrofobik ilaç moleküllerinin enkapsülasyonu (nanokapsül ya da nanoküre formlarında) için kullanılmıştır. Bu yöntemde çözücü ve çözücü olmayan fazların hazırlanması gereklidir, bunu takiben bir fazın diğerine karıştırılarak eklenmesi gerekir (Şekil 1.6.). Organik çözücünün ortam sıcaklığında veya bir rotavapor ile buharlaştırılması, sulu faz içerisinde nanopartikül süspansiyonunun elde edilmesini sağlar. Sulu fazın uzaklaştırılması için bir sonraki adımda ultrasantrifüj ve dondurarak kurutma yöntemleri kullanılabilir. Temel olarak, organik faz film oluşturan bir polimer, bir veya birden fazla etkin madde ve bir veya daha fazla organik çözücü içerir. Çözücü ve çözücü olmayan fazlar genellikle sırasıyla organik ve sulu fazlar olarak adlandırılır. Doğal, sentetik ya da yarı sentetik polimerler kullanılabilir. Nanoküre yerine nanokapsül elde etmek amacıyla formülasyona mineral yağ veya bitkisel yağ eklenebilir. Nanopartikül agregasyonunun önlenmesi için formülasyona yüzey aktif maddeler eklenebilir (Martinez Rivas vd., 2017).

Nanopresipitasyon yöntemiyle hazırlanan nanopartiküllerin özellikleri formülasyon ve proses parametrelerine bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterebilir. Partikül büyüklüğünü etkileyen parametrelerden biri karıştırma hızıdır. Karıştırma hızının artırılması, çözücünün daha hızlı difüzyonuna yol açarak partikül büyüklüğünde küçülmeye neden olur (Tran vd., 2016; Zhang vd., 2006). Organik/sulu faz oranında, sulu faz hacminin artması, suyla karışabilen çözücünün sulu faza difüzyonunu artırır. Ancak belirli bir noktadan sonra bu difüzyon o kadar hızlı gerçekleşir ki, polimer aglomere olmadan hemen çöker (Budhian vd., 2007). Yüzey aktif madde konsantrasyonundaki artış başlangıçta partikül büyüklüğünün azalmasına neden olur çünkü bu maddeler damlacıkların birleşmesini önler (Akmal Johari vd., 2024; Patel vd., 2022). Ancak artan yüzey aktif madde konsantrasyonunun artmasıyla sulu fazın viskozitesi arttığından, damlacıkların parçalanması için gerekli kayma gerilimi yetersiz kalır ve bu da partikül boyutunun tekrar artmasına neden olabilir. Polimer konsantrasyonu arttığında ise organik fazın viskozitesi arttığı için partikül büyüklüğü de artar (Badri vd., 2017; Bhattacharya, 2022; Diwan vd., 2021). Benzer şekilde, kullanılan polimerin moleküler ağırlığı arttıkça, organik çözelti viskozitesi yükselir ve bu da partikül büyüklüğünü etkiler (Martinez Rivas vd., 2017).

Etkin madde enkapsülasyon verimliliği de çeşitli parametrelere bağlıdır. Polimer konsantrasyonu arttığında, partikül büyüklüğü ile doğru orantılı olarak etkin madde enkapsüle olma kapasitesi artar. Daha büyük partiküller, daha fazla etkin madde enkapsülasyonuna imkan tanır (Akmal Johari vd., 2024; Chorny vd., 2002; Patel vd., 2022). Ancak, organik

faz/sulu faz oranı değiştiğinde, özellikle sulu faz hacmi arttığında, lipofilik etkin maddenin sulu fazda çözünme potansiyeli artar ve bu da etkin maddenin sulu faza kaçışını artırarak enkapsülasyon verimliliğini düşürür (Blouza vd., 2006; Budhian vd., 2007). Ayrıca, kullanılan etkin maddenin konsantrasyonunun artması da belirli bir noktadan sonra verimliliği azaltabilir. Çünkü polimerin etkin madde taşıma kapasitesi sınırlıdır ve bu sınır aşıldığında üretim sırasında fazla etkin madde kaybolabilir (Ozturk vd., 2024).

Çalışmamızda da incelediğimiz hiperisin gibi lipofilik etkin maddeler ile yapılan nanopartikül çalışmalarında farklı polimerler kullanılmıştır. **PCL** (Alves vd., 2007; Coco vd., 2023; Friedrich vd., 2008; Hasan vd., 2007; Khayata vd., 2012; Michalowski vd., 2004; Nafee vd., 2013; Oliveira vd., 2018; Perez vd., 2000; Pohlmann vd., 2008), **poli laktik asit (PLA)** ve **poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA)** bu polimerlere örnek olarak verilebilir (Barichello vd., 1999; Cascone vd., 2002; Chorny vd., 2002; Gomez-Gaete vd., 2007; Korzhikov vd., 2016; Penjweini vd., 2015; Penjweini vd., 2019; Saxena vd., 2004; Zeisser-Labouebe vd., 2006). Bunun dışında kitozan, jelatin, PEG ve Eudragit gibi çeşitli polimerler de nanoçöktürme yöntemiyle nanopartikül hazırlanmasında kullanılmıştır (Martinez Rivas vd., 2017).

Zeisser-Labouebe vd. (2006), hiperisin yüklü nanopartiküllerin kanser tedavisinde fotodinamik aktivitesini değerlendirmek için farklı polimerik nanopartiküllerini hazırlamışlardır. Hiperisin yüklü nanopartiküller, PLA ve PLGA polimerlerinden asetonda nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır. Etkin madde yükleme etkinlikleri incelendiğinde PLA ile hazırlanan nanopartiküllere yükleme etkinliği %69 iken, PLGA'da %15 seviyelerinde kalmıştır. Nafee vd. (2013)'nin hiperisin yüklü PCL nanopartiküllerin antimikrobiyal fotodinamik aktivitesini değerlendirdikleri çalışmada, PCL nanopartiküllerinde hiperisinin yükleme etkinliği %75 olarak tespit edilmiştir. PLA polimeri PLGA'ya kıyasla avantajlı gibi görünmesine rağmen, genel olarak PCL çalışmalarında etkin madde yükleme etkinliğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Barichello vd., 1999; Friedrich vd., 2008; Khayata vd., 2012; Oliveira vd., 2018; Penjweini vd., 2015).

Hiperisin gibi hem sulu ortam stabilitesi hem de fotostabilite problemleri olan etkin maddeler için nano ve mikropartiküllerin hazırlanması, duyarlı etkin maddeleri dış çevreden koruyarak stabilitesini artırması yönüyle de avantajlıdır. Li vd. (2012), kurkumin'in yara iyileştirici etkisinden yararlanmak üzere karboksimetil kitozan ve oksijenlenmiş aljinattan oluşan bir hidrojel geliştirmişlerdir. Ancak lipofilik kurkuminin sulu ortam stabilitesinin düşük

olması kullanımını kısıtlamıştır. Bu dezavantajın üstesinden gelmek için metoksi polietilen glikol kopolimeri kullanılarak nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan kurkumin içeren nanopartiküllerin fizyolojik ortam koşullarında fosfat tamponlu tuz çözeltisi ortamına maruz bırakıldığında stabilitelerinin arttığı tespit edilmiştir. Saxena vd. (2004) ise, ısı ve ışığa duyarlı, sulu ortamda stabil olmayan indosiyaninin PLGA nanopartiküllerini hazırlayarak stabilitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Sulu ortam stabilitesinin, nanopartikül olmayan formuna göre yaklaşık dört kez arttığı, ışığa maruz bırakıldığında degradasyon hızının beş kat daha yavaş olduğu ve ısı uygulamasına karşı tamamen koruma sağlandığı gözlenmiştir. Yine benzer şekilde literatürlerde ışığa duyarlı hiperisinin degrade olmadan fotodinamik antikanser aktivitelerini sürdürebilmesi için nanopartikül formülasyonlarının hazırlandığı tespit edilmiştir (Lima vd., 2013; Youssef vd., 2012; Zeisser-Labouebe vd., 2006).

1.5.3. Kombine Sistemler

Yara iyileşmesinde kombine yaklaşımlar, hem farklı taşıyıcı yapıların bir arada kullanılması (örneğin partikül ve film kombinasyonları) hem de birden fazla etkin maddenin sinerjik biçimde uygulanması ile tedavi etkinliğini artırmaya yönelik olarak geliştirilmektedir. Bu sistemler, iyileşme sürecinin yalnızca bir yönünü değil; enflamasyonun baskılanması, enfeksiyonun önlenmesi, hücresel proliferasyonun teşviki ve dokunun yeniden yapılanmasının desteklenmesi gibi çoklu biyolojik süreçlere aynı anda etki etme potansiyeline sahiptir. Taşıyıcı sistemlerin kombinasyonuna örnek olarak, Monou vd. (2022)'nin çalışmasında, kannabidiol ve kannabigerol içeren nanopartiküller 3B baskı teknolojisiyle üretilen aljinat film içerisine yüklenmiş ve bu yapının yara iyileşmesi üzerindeki potansiyel etkileri araştırılmıştır. Formülasyonda kullanılan nanopartikül yapısı sayesinde, etkin maddelerin sulu ortamda çözünürlüğü ve biyoyararlanımı artırılmış, film matrisi içerisinde kontrollü salım sağlanarak etkinin sürekliliği hedeflenmiştir. Yapılan *in vitro* değerlendirmeler sonucunda, kombine sistemin hücre proliferasyonunu desteklediği, oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağladığı ve yara iyileşmesini destekleyici özellikler gösterdiği ortaya konmuştur. Benzer şekilde, Basit vd. (2021), mikrodalga ile fiziksel olarak çapraz bağlanmış sodyum aljinat–pektin bazlı bir film yapısını, kitozan-kurkumin nanopartikülleri ile kombine etmiş, böylece film yapısının bariyer özelliği ile partikül içeriğinin antioksidan ve antienflamatuvar etkilerini aynı sistemde birleştirmiştir. Jaiswal vd. (2019), karragenan bazlı hidrojel film içerisine kükürt nanopartikülleri ve greyfurt çekirdeği ekstresi kombine ederek antimikrobiyal ve hücre yenileyici etkilerin birlikte sunulduğu fonksiyonel bir yapı geliştirmiştir. Wang vd. (2020) ise kitozan film yapısını arginin ve altın nanopartikülleri ile güçlendirerek, filmlerin

hidrofilikliğini, mekanik dayanıklılığını ve antibakteriyel özelliklerini artırarak hücre adezyonu ve proliferasyonu için biyouyumlu bir ortam sağlamıştır. *In vitro* değerlendirmelerde, modifiye edilmiş filmlerin hücre canlılığını desteklediği ve yara iyileşmesinde rol oynayan proteinlerin ekspresyonunu artırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, *in vivo* deri defekt modellerinde, bu kombine filmlerin yara kapanmasını, re-epitelizasyonu ve kolajen birikimini hızlandırdığı tespit edilmiştir. Mojtahedi vd. (2025) tarafından yürütülen bir başka çalışmada, antimikrobiyal ve yara iyileştirici potansiyeli olan *Ferula gummosa* ekstresi, metal-organik kafes yapısı olan zirkonyum bazlı UIO-66 ile desteklenerek polimerik bir hidrojel formülasyonu geliştirilmiştir. *In vitro* analizlerde, hidrojin kontrollü salım sağladığı ve fibroblast hücrelerinde sitotoksikite göstermediği raporlanmıştır. *In vivo* yara iyileşme modeli kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu kombinasyonun enflamasyonu azalttığı, granülasyon dokusu oluşumunu hızlandırdığı ve epitelizasyonu artırdığı gözlemlenmiştir. Suntar vd. (2011), *H.perforatum* yağına *Salvia triloba* (adaçayı) ve *Origanum* (kekik) türlerinin uçucu yağlarını ekleyerek hazırladıkları merhem formülasyonunun, tekli kullanıma göre daha güçlü yara iyileştirici etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu durum, adaçayı ve kekik yağlarının antimikrobiyal özellikleri sayesinde yara iyileşme sürecinin erken aşamalarında enfeksiyon riskini azaltarak iyileşmeyi desteklemesiyle açıklanmaktadır. Ayrıca formülasyonun yara iyileşme sürecinin farklı aşamalarında etkili olduğu ve bileşenler arasındaki sinerjistik etkileşimlerin tedavi etkinliğini artırdığı gösterilmiştir.

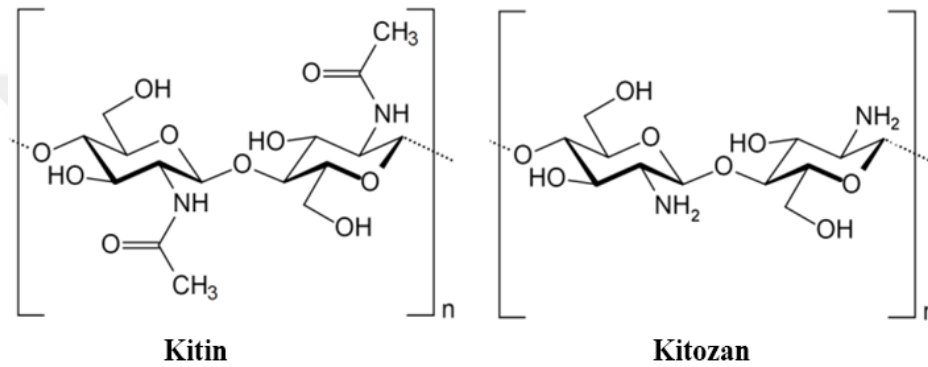
Tüm bu çalışmalar, kombine sistemlerin yara iyileşmesine çok yönlü katkı sağladığını, sinerjistik etkilerle tedavi süresini kısaltabildiğini ve bu nedenle geleneksel ya da tekli formülasyonlara göre daha üstün farmakolojik performans sergileyebildiğini göstermektedir. Bu nedenlerle çalışmamızda yara iyileştirici *H.perforatum* yüklü nanopartikül ve antimikrobiyal borik asidi bir arada içeren kombine ilaç şeklinin hazırlanmasına karar verilmiştir.

1.6. Tez Çalışmasında Film ve Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması için Kullanılan Polimerlerle İlgili Genel Bilgiler

1.6.1. Film Formülasyonlarında Kullanılan Polimer: Kitozan

Kitozan, karides ve yengeç gibi kabuklu deniz canlılarının dış iskeletlerinde bulunan kitinden elde edilen ve kullanımı FDA tarafından onaylanmış doğal bir polimerdir. Kitin, yengeç ve diğer kabuklu deniz canlılarının dış iskeletlerinde ve mantar hücre duvarlarında

doğal olarak bulunur. Kitin, β -(1,4)-bağlı N-asetilglukozamin birimleri içeren bir polimerdir (Şekil 1.7.). Kitozan, kitinin deasetilasyon sürecinden geçirilmesiyle elde edilen bir türevidir. Deasetilasyon derecesi kitozanın kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirleyen önemli bir parametredir. Kitozan, zayıf bazik bir yapıya sahip olup pH 6,5'in altındaki asidik ortamlarda çözünürken, pH 7,0 ve üzerindeki nötr ve bazik ortamlarda çözünmez. Ayrıca, organik çözücülerde çözünürlüğü oldukça sınırlıdır ve bu durum kitozanın kullanım alanlarını etkileyen önemli faktörlerden biridir. Ancak, çözünürlüğü uygun modifikasyon teknikleri veya belirli organik asit çözeltileri (örneğin asetik asit, formik asit) kullanılarak iyileştirilebilir (Alemdaroglu vd., 2006; Mawazi vd., 2024; Rajinikanth vd., 2024; Sakai vd., 2024).



Şekil 1.7. Kitin ve kitozanın kimyasal yapısı

Son yıllarda, biyouyumluluğu, biyobozunabilirliği ve ilaç taşıma sistemlerindeki etkinliği sayesinde kitozan, farmasötik araştırmaların önemli bir odak noktası haline gelmiştir. Kitozan, uygun çevresel koşullarda lizozim ve diğer mikrobiyal enzimler tarafından enzimatik parçalanmaya uğrar ve bu süreç sonunda toksik olmayan bozunma ürünleri ortaya çıkar. Bu özellik, özellikle polimer kalıcılığının istenmediği kontrollü salım sistemleri veya çevre dostu ambalaj malzemeleri gibi uygulamalar için oldukça avantajlıdır. Özellikle nanopartikül, hidrojel, film ve mikroküre gibi çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerdeki potansiyeli ve kitozanın biyolojik aktivitesinden dolayı çok yönlü kullanım alanları gibi nedenlerle bilimsel çalışmalarda dikkat çekici hale gelmiştir (Mawazi vd., 2024; Rajinikanth vd., 2024; Sakai vd., 2024).

Kitozan, antienflamatuvar ve antimikrobiyal özelliklerinin yanı sıra hücre büyümesini ve kan damarı oluşumunu destekleme kapasitesi nedeniyle, özellikle yara iyileşmesi alanında kullanılmaktadır (Alemdaroglu vd., 2006; Ebhodaghe, 2022; Elviri vd., 2017a; Mawazi vd., 2024). Yapılan çalışmalar, kitozanın konsantrasyonuna, uygulama yöntemine ve dozaj formuna bağlı olarak pro- veya antienflamatuvar etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur. Kitozan, makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler gibi bağışıklık sistemi hücrelerini

uyararak enflamatuvar yanıtı tetikleyebilir. Bu aktivasyon sonucunda, pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimi artar. Bu pro-enflamatuvar etki, yeni kan damarlarının büyümesini ve bağışıklık hücrelerinin hasarlı bölgeye göçünü teşvik ederek yara iyileşmesini destekleyebilir. Öte yandan, kitozanın TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) gibi enflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini azaltarak antienflamatuvar özellik gösterdiği bilinmektedir. Kitozanın bu antienflamatuvar etkisinin, bağışıklık hücrelerinde mikrobiyal bileşenlerin algılanmasında ve enflamatuvar yanıtın başlatılmasında önemli bir rol oynayan Toll-benzeri reseptörlerle (TLR) etkileşimi sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Kitozanın pro-enflamatuvar genlerin üretimini kontrol eden sinyal yollarını etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca yara bakımında biyoadeziv polimerik materyallerin kullanımı hem yara iyileşmesini destekleyen etkileri hem de biyoadezyon özellikleriyle modern yara örtüsü uygulamalarında önemli bir yer tutmaktadır. Yara örtüsünde kullanılan polimerlerin biyoadeziv özellikleri sayesinde yapıştırıcı kullanımına gerek kalmadan yara yüzeyine kolayca uygulanabilir. Yara örtüsünün yarada kalış süresini artırarak terapötik etkinin sürekliliğini sağlar ve güvenilir bir etkin madde salım profili sunarak yara iyileşmesini optimize edebilir (Ahmady vd., 2022; Arezomand vd., 2024; Basha vd., 2018; Bolgen vd., 2020; Colobatiu vd., 2019; Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Hafezi vd., 2019; Oliveira vd., 2024).

Yapılan çalışmalar, kitozanın yara iyileşmesi için farklı dozaj formlarında ve teknolojilerle kullanılabileceğini göstermektedir. Örneğin, Hafezi vd. (2019), genipin ile çapraz bağlanmış kitozan esaslı film matrislerini SSE 3B baskı yöntemiyle üretmişlerdir. Bu filmler, uygun esneklik, yüksek şişme kapasitesi, mukoadeziv özellikler ve insan fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik olmaması sayesinde kronik yaralar için umut verici bulunmuştur. Ahmady vd. (2022), timol yüklü aljinat mikrokürelerini kitozan-jelatin'e dahil ederek elektrospınleme yöntemiyle hazırlanmış film çalışmasında, kontrollü salım ve antimikrobiyal etki yanında, *in vivo* analizlerde epitelizasyon ve kolajen birikimini hızlandırarak etkili yara iyileşmesi gözlemlenmiştir. Zoghi vd. (2021)'nin çalışmasında, çözücü dökme yöntemiyle kitozan bazlı filmler üretilmiş ve bu filmler minosiklin ile yüklenerek antibakteriyel yara örtüsü olarak değerlendirilmiştir. Minosiklin iki fazlı (önce hızlı, ardından yavaş) salım profili sergilemiş, özellikle gram pozitif bakterilere karşı güçlü antibakteriyel etki göstermiştir. Çalışmada, kitozanın doğal antimikrobiyal özelliğinin de katkısıyla minosiklinin etkisinin arttığı, ayrıca hücre canlılığı üzerinde %88'lik bir koruma sağladığı rapor edilmiştir. Oliveira vd. (2024), kitozan:PVA bazlı filmlere tatlı rezene yağı içeren nanoemülsiyonları dahil ederek su geçirgenliği azalmış, kontrollü salım özellikleriyle desteklenen ve farelerde hızlandırılmış yara kapanması sağlayan etkili bir sistem elde etmişlerdir. Lazaridou vd. (2024), kitozan bazlı

biyomürekkep kullanarak SSE 3B baskı yöntemiyle yara örtüsü üretmişlerdir. Üretilen yapılar, yüksek su tutma kapasitesi, biyouyumluluk ve antibakteriyel özellikler göstermiştir. Günümüzde kitozan, farmasötik alan dışında, gıda, kozmetik ve tarım gibi çeşitli sektörlerde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda sektöründe doğal koruyucu olarak, farmasötik alanda yara örtüleri ve ilaç taşıyıcı sistemlerinde, kozmetik alanında cilt bakım ürünlerinde ve tarımsal uygulamalarda verim artırıcı olarak tercih edilmektedir (Mawazi vd., 2024; Rajinikanth vd., 2024; Sakai vd., 2024; Tort vd., 2017).

Tüm bu veriler ışığında hem doğal antimikrobiyal etkisi hem yara bölgesinde nemli bir mikro çevre sağlayarak doku yenilenmesini desteklemesi, biyobozunur ve biyouyumlu olması, doğal biyoadeziv etkileri ve çözücü dökme yönteminden 3B baskı yöntemi gibi daha gelişmiş teknolojilere adapte edilebilmesi gibi nedenlerle bu tez çalışmasında kitozan tercih edilmiştir.

1.6.2. Nanopartikül Formülasyonlarında Kullanılan Polimer: Polikaprolakton

Polikaprolakton (PCL), yarı kristal, hidrofobik, biyolojik olarak uyumlu ve biyobozunabilir alifatik poliester grubu bir polimerdir. Yüksek ilaç geçirgenliği, yavaş *in vivo* bozunma özellikleri, viskoelastik özellikleri ve toksisite göstermemesi gibi özellikler PCL'yi çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında uygun bir polimer haline getirmektedir. Ayrıca, farmasötik alanda PCL ile üretilen mikro ve nano ölçekli taşıyıcılar ile ilgili çok sayıda çalışma yer almaktadır. PCL, diğer sentetik polimerlerle karıştırılabilir veya kopolimerize edilebilir. PCL'nin diğer kullanım alanları arasında doku mühendisliği, kemik, bağ, kırık, deri, sinir ve damar dokularının rejenerasyonu için skafold sistemleri ve doku mühendisliği gibi alanlar yer almaktadır (Akmal Johari vd., 2024; Badri vd., 2017; Coco vd., 2023).

Akmal Johari vd. (2024)'nin çalışmasında, *Acalypha indica* Linn. bitkisinden elde edilen ekstraktların, kitozan ve PCL polimer karışımları kullanılarak mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte, PCL'nin biyobozunur ve hidrofobik özellikleri, kitozan ile birlikte partikül oluşumunu optimize etmek için kullanılmıştır. Elde edilen mikrokapsüller bitki stresinin stabilitesini artırmış ve kontrollü salım özellikleri göstermiştir. Sonuçlar, bu tür polimer karışımlarının, bitki bazlı etkin maddelerin biyoyararlanımını ve terapötik etkinliğini artırmada etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir. Badri vd. (2018)'nin çalışmasında, indometasin ve *Nigella sativa* L. uçucu yağı, PCL bazlı nanopartikül içinde enkapsüle edilerek topikal enflamasyon tedavisi için bir sistem geliştirilmiştir. Nanopresipitasyon yöntemiyle hazırlanmış yaklaşık 230–260 nm boyutlarında, -20 ile -30 mV

zeta potansiyeline sahip partiküller ile indometasin ve *Nigella sativa* uçucu yağı için sırasıyla %70 ve %84 enkapsülasyon verimliliği elde edilmiştir. Bu formülasyon, indometasinin deriden penetrasyonunu artırarak antienflamatuvar ve analjezik etkilerini güçlendirmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin 30 gün boyunca farklı sıcaklıklarda stabil kaldığı tespit edilmiştir. Kasinathan vd. (2016), kurkumin yüklü PCL nanopartiküllerini emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlayarak, partikül boyutunun formülasyondaki PCL miktarına ve yardımcı bileşen oranlarına bağlı olarak önemli ölçüde değiştirilebildiğini göstermiştir. Artan PCL içeriği ile daha küçük ve daha homojen partiküller elde edilmiş, bu da sistemin kararlılığını ve salım profilini iyileştirmiştir. Patel vd. (2022), silibinin taşıyan PCL nanopartiküllerle yüksek enkapsülasyon verimi ve uygun partikül boyutları elde etmiş; bu sistemin özellikle antikanser etki açısından oldukça etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Diwan vd. (2021) ise PCL bazlı kilnidipin nanopartiküllerini nanoçöktürme yöntemiyle üretmiş ve PCL'nin, etkin maddenin taşıyıcı matrisine entegre edilmesini kolaylaştırarak hem partikül boyutunu hem de yükleme kapasitesini olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Ribeiro vd. (2013) de PCL kullanarak hazırladıkları *Uncaria tomentosa* ekstresi taşıyan nanopartiküler sistemde %89,1 enkapsülasyon verimi ve 280 nm ortalama partikül boyutu elde etmişlerdir. PCL'nin burada sağladığı avantajlar arasında yüksek taşıma kapasitesi, kararlı partikül boyutu ve istenilen yüzey yükü profili yer almaktadır. Tüm bu çalışmalar, PCL'nin kontrollü salım, bitki ekstresi kaynaklı lipofilik etkin maddeler için yüksek enkapsülasyon ve partikül stabilitesi açısından formülasyona önemli katkılar sunduğunu ortaya koymaktadır.

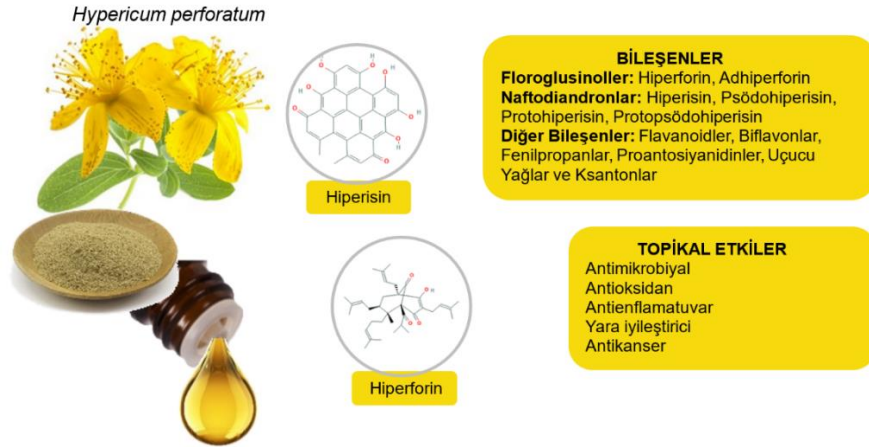
1.7. Çalışmada Kullanılan Etkin Maddelerle İlgili Genel Bilgiler

1.7.1. *Hypericum perforatum*

Hypericum perforatum (*H.perforatum*), diğer adıyla St. John's wort veya sarı kantaron, yağlı maseratları ve alkollü ekstreleriyle topikal olarak yara iyileşmesinde uzun yıllardır kullanılmakta olan tıbbi bitkilerden biridir (Ang vd., 2004; Ayran ve Kan, 2022; Błońska-Sikora vd., 2025; Buke vd., 2023; Castro vd., 2012; Dikmen vd., 2011; Egilmez vd., 2015; Farasati Far vd., 2024; Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Kıyan vd., 2015; Koyu ve Haznedaroglu, 2015; Kurt ve Aslan, 2025; Lyles vd., 2017; Nafee vd., 2013; Nahrstedt ve Butterweck, 1997; Orhan vd., 2013; Ozturk vd., 2007; Pourhojat vd., 2016; Reichling vd., 2001; Saddiqe vd., 2010; Suntar vd., 2010; Sut vd., 2023; Tavli vd., 2020; Vujanovic ve Vujanovic, 2013; Wolfle vd., 2014; Yucel vd., 2017; Zhang vd., 2020). Türk halk tıbbında olduğu gibi dünya genelinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Avrupa İlaç Kurumu (European Medicines Agency, EMA)

Bitkisel Tıp Ürünleri Komitesi (Committee on Herbal Medicinal Products, HPMC) tarafından yayımlanan 2009 monograflarında, *H.perforatum*'un yara iyileşmesi ve deri enfeksiyonlarında topikal kullanımı gösterilmektedir. Klinik çalışmalar, *H.perforatum* yağlı ekstresinin yatak yaraları ve sezaryen yaralarının tedavisinde topikal olarak etkili olduğunu göstermektedir (Samadi vd., 2010; Yucel vd., 2017). *In vivo* çalışmalarda, bu yağlı ekstrenin mupirosin ile kıyaslandığında yara iyileşmesinde etkili olduğu ve anjiyogenez oluşumunu desteklediği bildirilmiştir (Nayak vd., 2017). Ayrıca, eksizyon, insizyon ve yanık yaralarında *H.perforatum* ekstrelerinin iyileştirici etkileri farklı çalışmalarda kanıtlanmıştır (Ali vd., 2018; Dikmen vd., 2011; Kıyan vd., 2015; Prisacar vd., 2013; Suntar vd., 2010; Yadollah-Damavandi vd., 2015). *H.perforatum*'un plak tipi sedef hastalığı (psöriazis) tedavisinde etkinliği de araştırılmış ve bu etkinin bitkinin antienflamatuvar ve antimikrobiyal bileşenlerinden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Błońska-Sikora vd., 2025; Farasati Far vd., 2024; Najafizadeh vd., 2012). Bununla birlikte, *H.perforatum*'un topikal kullanımında ışığa duyarlılık en önemli yan etki olarak kabul edilmekte ve kullanım sırasında doğrudan güneş ışığından kaçınılması önerilmektedir.

H.perforatum'un kimyasal içeriği, yetiştiği bölgeye, hasat zamanına, hazırlama yöntemine ve saklama koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Genel olarak bitki, floroglusinoller (hiperforin ve analogları), naftodiantronlar (hiperisin ve analogları), flavonoidler, biflavonlar, fenilpropanlar, proantosiyonidinler, uçucu yağlar ve ksantonlar gibi bileşenleri içerir (Şekil 1.8.) (Ali vd., 2018; Bergonzi vd., 2001; Farasati Far vd., 2024; Hamedi vd., 2024; Koyu ve Haznedaroglu, 2015; Orhan vd., 2013; Saddiqe vd., 2010; Wolfle vd., 2014). Klinik çalışmalarda hiperforin ve hiperisin, *H.perforatum*'un yara iyileştirici etkisinden sorumlu lipofilik bileşenler olarak tanımlanmıştır (Ali vd., 2018; Dikmen vd., 2011; Farasati Far vd., 2024; Karagül vd., 2024; Lyles vd., 2017; Nafee vd., 2013; Ozturk vd., 2007; Pourhojat vd., 2016; Reichling vd., 2001; Suntar vd., 2010; Wolfle vd., 2014; Yucel vd., 2017). Hücresel düzeyde yapılan araştırmalarda, fibroblast göçünü artırarak yara iyileşmesini hızlandıran ana bileşiğin hiperforin olduğu ve bu etkinin hiperisinden kaynaklanmadığı sonucuna (Ozturk vd., 2007) varılsa da daha sonraki histolojik incelemelerde artmış kollajen ve fibroblast oranı ile epitelizasyonu hızlandırması ve yara iyileşme sürecinde antienflamatuvar bir direnç oluşturması hiperisin ile açıklanmıştır (Suntar vd., 2010). Ayrıca, *H.perforatum* yağının ve ekstrelerinin *S.aureus*'a karşı güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve biyofilm oluşumunu önlediği gösterilmiştir (Lyles vd., 2017).

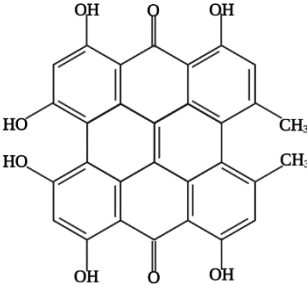
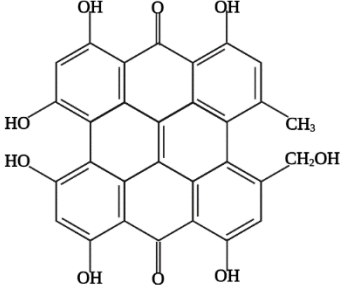


Şekil 1.8. *Hypericum perforatum* bileşenleri ve topikal etkileri

Genel olarak *H.perforatum*'un yara iyileştirici etkisi hiperisin ve hiperforin bileşenlerine bağlansa da ekstrede bulunan diğer bileşenler arasındaki etkileşimlerin biyoaktivite üzerinde sinerjistik bir etki yarattığı düşünülmektedir (Hammer vd., 2007; Schmitt vd., 2006). Tüm bileşenleri içeren standardize *H.perforatum* ekstresiyle (Şekil 1.8.) aynı dozda saflaştırılmış ayrı ayrı bileşenlerin antimikrobiyal özellikleri araştırıldığında, tek başına bileşenlerin kullanımına göre standardize ekstre daha başarılı bulunmuş ve bu durum ekstredeki bileşenlerin sinerjistik etkisi ile açıklanmıştır (Mortensen vd., 2012).

Avrupa Farmakopesi'nde *H.perforatum*'un etkin bileşenlerinden hiperisin tayininde total hiperisin olarak Hiperisin ve Psödohiperisin yer almaktadır (EP10) ve total hiperisinlerin özellikleri Çizelge 1.2.'de gösterilmektedir.

Çizelge 1.2. *H.perforatum*'da yer alan total hiperisinlerin fizikokimyasal özellikleri (Ang vd., 2004; Bauer vd., 2001; Doukani vd., 2020; EP10; Gioti vd., 2005; Kacerovská vd., 2008; Piperopoulos vd., 1997; USP44).

	Hiperisin	Psödohiperisin
		
Kapalı formül	: C ₃₀ H ₁₆ O ₈	C ₃₀ H ₁₆ O ₉
Kimyasal okunuşu	: 1,3,4,6,8,13-heksa-hidroksi-10,11-dimetilpenantro [1,10,9,8-opqra] perilen-7,14-dion	1,3,4,6,8,13-heksa-hidroksi-10- (hidroksimetil)-11-metilfenantro [3,4,5,6-fghij] perilen-7,14-dion
Molekül ağırlığı	: 504,4 g/mol	520,4 g/mol
Organoleptik özellikleri	: Kahverengimsi siyah toz	
Çözünürlük	: Suda çözünmez, DMSO, metanol, etanol gibi organik çözücülerde ve alkali çözeltilerde serbestçe çözünebilir.	
Erime sıcaklığı	: 299-301°C	
Saklama koşulları	: Ağzı sıkıca kapalı kaplarda, ışıktan ve nemden korunarak saklanmalıdır.	

H.perforatum'un antimikrobiyal etkisi kanıtlanmış olmakla birlikte, yapılan çalışmalar gram-negatif bakterilere karşı etkinliğinin, gram-pozitif bakterilere kıyasla daha sınırlı olduğunu göstermektedir (Kucuk ve Yıldırım, 2019; Lyles vd., 2017; Orhan vd., 2013). Topikal uygulamalarda *H.perforatum*'un yara iyileşmesinden sorumlu bileşeni olan hiperisin, deriye absorbe olduğunda hiperisizm adı verilen fototoksik deri reaksiyonlarına neden olabilmektedir (Kacerovská vd., 2008; Lyles vd., 2017; Saddiqe vd., 2010). Ang vd. (2004) tarafından yapılan stabilite çalışmasında, hiperisin moleküllerinin sulu çözeltilerde, asidik ortam koşullarında ve ışık maruziyeti altında stabil olmadığı ve ışık etkisiyle foto türevlerine dönüştükleri gösterilmiştir. UV ışık ile aktive olan hiperisin, insan keratinosit ve melanosit hücrelerinde sitotoksik ROS oluşturarak doku yıkımına yol açmaktadır (De Moraes vd., 2019; Fadel vd., 2010; Farasati Far vd., 2024; Huygens vd., 2005a; Huygens vd., 2005b; Kacerovská vd., 2008; Lyles vd., 2017; Nafee vd., 2013; Penjweini vd., 2015; Penjweini vd., 2019; Pereira vd., 2020; Youssef vd., 2012). Bu özellik, antikanser araştırmalarda tümör dokularının hedeflenmesi için avantaj sağlasa da yara tedavisi açısından istenmeyen bir durumdur. Bu

nedenle, hiperisin fototoksitesinin minimize edilerek yara iyileştirici etkinin maksimum düzeye çıkarılması gerekmektedir.

Ayrıca, hiperisin lipofilik yapısı nedeniyle fizyolojik pH'da ve sulu ortamlarda agregasyon eğilimi göstermekte ve bu durum biyolojik aktivitesini azaltmaktadır (Fadel vd., 2010; Huygens vd., 2005a; Pereira vd., 2020). Disch vd. (2017) ticari olarak temin ettikleri ticari *H.perforatum* kuru ekstresindeki hiperisinlerin pH'ya duyarlı çözünürlüğünü incelemişlerdir. Bunun için pH aralığı pH 1,2 ile pH 7,5 olan tampon ortamlarında 37°C'de 90 rpm hızda inkübatörlü çalkalayıcıda çözünürlük çalışmasında, 24 ve 48. saatlerde numuneler alınarak yapılan miktar tayinleri sonucunda, hiperisinin, en düşük çözünürlüğün pH 1,2'de ölçüldüğü ($4,61 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$), en düşük çözünürlüğün pH 6,8'de ölçüldüğü ($23,78 \pm 0,43 \mu\text{g/ml}$) ve çözünürlüğünün pH'ya duyarlı olduğu bildirilmiştir. Aynı bulgular psödohiperisin için de belirlenmiş ve çözünürlüğünün pH'ya duyarlı olduğu bildirilmiştir. Hiperisin'in aksine Psödohiperisin'in en düşük ve en yüksek çözünürlük sergilediği pH değerleri sırasıyla pH 7,5'te $2,97 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$ iken pH 5,5'te $9,84 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Bu durum hiperisinlerin pKa değerleri ile açıklanabilir (Gaohua vd., 2021). İyonlaşma pH ve pKa'ya bağlı olduğundan, iyonlaşabilen bir etkin maddenin sulu ortamdaki çözünürlüğü pH'a bağlıdır. Asidik bir bileşik için, alkali koşullarda daha fazla etkin madde molekülü iyonlaştığından çözeltideki pH arttığında çözünürlük artar. Tersine, bazik bir bileşiğin çözünürlüğü, çözeltinin pH'ı düştüğünde artar. Amfoterler ve zwitteriyonlar, en az biri asidik ve en az biri bazik olmak üzere en az iki pKa değerine sahip moleküllerdir (Comer ve Manallack, 2014). Amfoterler genellikle lipofiliktir ve nötr formlarında en az çözünür. Ancak zwitteriyonlar her zaman yüklüdür; nadiren lipofiliktirler ve genellikle herhangi bir pH'da suda çözünürler. Amfoter ve zwitteriyon bileşikleri için, etkin madde molekülleri normalde fizyolojik pH'ta yüksüzdür ve bu da düşük bir çözünürlükle sonuçlanır. Çözelti pH'sı önemli ölçüde yüksek veya düşük olduğunda, bu amfoter ve zwitteriyon bileşiklerinin çözünürlüğünde artış gözlemlenebilir. Hiperisin 2 ve 11 olmak üzere iki pKa değerine sahip amfoter yapıdadır. Hiperisinin sahip olduğu iki farklı iyonizasyon grubu pH 6,8'e denk gelen izoelektrik noktada net yükü sıfırdır ve her iki grup da iyonize halde olduğu için maksimum çözünürlük elde edilmiştir. Psödohiperisin ise pKa değeri 7,2 olduğu için en düşük çözünürlük pH 7,5'te tespit edilmiş, en yüksek çözünürlük pH 5,5'te belirlenmiştir. pKa değerinin altındaki pH'da çözünürlüğünün arttığı, pKa'ya yakın pH'larda noniyonize halde olduğu gözlenmiştir. Bu literatür verilerine göre hiperisinin pKa'sı düşünüldüğünde yara örtüsü çalışmalarında çözünme ortamı olarak kullanılacak olan pH 7,4 çözünme ortamının hiperisin için uygun olduğu belirlenmiştir.

EMA tarafından yayımlanan HPMC monografına göre, *H.perforatum*'un yağlı maseratlarının hazırlanmasında bitkisel yağlar kullanılmaktadır. Bu yöntemle hazırlanan ekstreler genellikle 1:4-1:20 (bitki:çözücü) oranındadır ve taze veya kurutulmuş bitkinin yağ içerisinde maserasyon yöntemiyle ekstrakte edilmesiyle elde edilmektedir. Maserasyon süresi kullanılan yöntemle ilgili olarak 2 gün ile birkaç hafta arasında değişir ve ekstraksiyon işlemi sıklıkla güneş ışığına maruz bırakılarak hazırlandıktan sonra yara tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca %45-50 (h/h) etanol içeren çözücü ile 1:5-1:10 oranında hazırlanmış alkollü bitki ekstreleri de yara iyileşmesinde önerilmektedir (EMA). Kullanılan bitkinin yetiştiği bölgeye, hasat zamanına, hazırlama yöntemine ve saklama koşullarına bağlı olarak *H.perforatum*'un kimyasal içeriği değişiklik gösterdiği için çözücü konsantrasyonundaki farklılıklar da alkollü ekstrelerin de kimyasal bileşimini etkileyen önemli bir faktördür ve doğru tedavi dozunun uygulanabilmesi için hem bitkinin hem de ekstrenin standardizasyonu gereklidir. Avrupa Farmakopesi'ne (EP10) göre susuz *H.perforatum* ekstresinde hiperisin olarak % total hiperisin oranı %0,10 ile %0,30 arasında ve kuru bitkideki total hiperisin miktarı da minimum %0,08 olmalıdır (EP10).

H.perforatum ekstresinin FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) spektrumu, içeriğindeki fonksiyonel gruplara özgü karakteristik piklerin belirlenmesini sağlamaktadır. Literatürde *H.perforatum* ekstresi $3668-3248\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen OH gruplarına ait geniş transmisyon bandı, 2661 cm^{-1} ve 1276 cm^{-1} 'de sırasıyla C-H asimetrik gerilme ve CCO gerilme titreşimleri, 1635 cm^{-1} ve 1074 cm^{-1} 'de sırasıyla C=O ve C-O gerilme titreşim bantları ile karakterize edilmiştir (Mouro vd., 2021; Mutlu vd., 2022).

Bu tez çalışmasında *H.perforatum* içeren yara örtüsü çalışılması planlandığı için etkin madde miktar tayini çalışmaları incelenmiş, hiperisin bileşenlerinin analizinde çeşitli UV (Ali vd., 2018; Mouro vd., 2023) ve HPLC (Ayran ve Kan, 2022; Bergonzi vd., 2001; Brolis vd., 1998) yöntemleriyle elde edilen sonuçların seçiciliklerinin iyi olması nedeniyle kullanıldığı tespit edilmiştir. EP10'da HPLC metoduyla yapılan hiperisin analizinde, mobil faz (Etil asetat: Sodyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 2,0): Metanol (39:41:160)) karışımı, 1 ml/dk akış hızı, 5 µm C18 (250 x 4,6 mm) kolon, 20 µl enjeksiyon hacmi ve 40°C kolon sıcaklığı koşullarında 590 nm'de analiz edilebileceği bildirilmektedir.

Yapılan literatür taramaları, *H.perforatum*'un alkollü ekstrelerinin, yağlı ekstrelerine kıyasla daha yüksek oranda hiperisin içerdiğini ve bu ekstrelerden hiperisin analizinin yapılabildiğini göstermektedir (Ali vd., 2018; Arsić vd., 2010; Cabbaroğlu vd., 2019;

Gunpinar vd., 2020; Isacchi vd., 2007; Stoilkovska vd., 2016; Yucel vd., 2017). *H.perforatum* ekstresi çeşitli organik çözücüler ve ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak hazırlanabilmektedir. Avato ve Guglielmi (2008)'nin yaptığı bir çalışmada, maserasyon, dijesyon, sonikasyon ve soxhlet ekstraksiyon yöntemlerinin etanollü *H.perforatum* ekstrelerindeki bileşen verimi üzerindeki etkileri araştırılmış ve soxhlet yöntemiyle gerçekleştirilen 6 saatlik ekstraksiyonun, hiperisin verimi açısından en yüksek sonuçları sağladığı HPLC ve UV analizleri ile gösterilmiştir. Benzer şekilde, Cossuta vd. (2012), soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle etanol, 2-propanol, etil asetat ve n-hekzan kullanarak hiperisin verimini değerlendirmişlerdir. Hiperisin çözünürlüğünün, solventin polaritesindeki artışa bağlı olarak yükseldiği tespit edilmiş ve en yüksek hiperisin veriminin, oldukça polar bir çözücü olan etanol ile elde edildiği belirlenmiştir. Literatürde alkollerin, *H.perforatum*'un ekstraksiyonu ve analizi için yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Ali vd. (2018)'nin iki farklı otomatik solvent ekstraktör cihazı kullanarak metanol ve etanolün hiperisin ekstraksiyonundaki etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmada, en yüksek hiperisin veriminin etanol ile elde edildiği gösterilmiştir. Ayrıca, farklı sıcaklık uygulamalarının hiperisin verimi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda, hiperisin verimi daha yüksek olması için çalışmamızda soxhlet ekstraksiyon yöntemi kullanılarak etanollü *H.perforatum* ekstrelerinin hazırlanmasına karar verilmiştir.

Kaya ve Doğan (2022), *H.perforatum*, *Calendula officinalis* ve *Aloe vera* ekstraktlarını bir araya getirerek, insizyonel yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırmışlardır. Bu kombinasyonun seçilmesinin nedeni, her bir bitkinin yara iyileşmesinin farklı aşamalarında sinerjik etkiler göstererek, iyileşme sürecini hızlandırmayı ve etkinliğini artırma olasılığıdır. Araştırma bulgularına göre, deney grubunda yara iyileşme süreci daha hızlı ilerlemiş ve histopatolojik incelemelerde yara iyileşmesinin 21 günde tamamlandığı gözlemlenmiştir. Altıparmak vd. (2019), *H.perforatum*, *Liquidambar orientalis* (sığla) ve propolis kombinasyonunun enflamasyon azaltıcı ve epitelizasyonu artırıcı etkilerini *in vivo* çalışmalar ile doğrulamıştır. Seyhan (2020), kurkumin ve *H.perforatum*'un yanık modelinde birlikte kullanımının, enflamasyon baskılanması ve fibroblast aktivasyonunu artırma yönünden tekli uygulamalardan daha etkin olduğunu göstermiştir. Uzunhisarcikli ve Yerer (2022), *H.perforatum* yağı ile nar çekirdeği yağının (*Punica granatum*) insan fibroblast hücreleri kullanılarak, bu kombine yağ uygulamalarının hücre proliferasyonu, migrasyonu ve kolajen üretimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Sonuçlar fibroblast proliferasyonu ve kolajen sentezi üzerindeki etkilerinin birlikte artış gösterdiğini tespit etmiştir. Bu etkiler, yara iyileşme sürecinde önemli rol oynayan hücresel aktivitelerin desteklenmesi açısından önemlidir.

Ayrıca, her iki yağın da antioksidan özelliklere sahip olduğu ve oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Yalcinkaya vd. (2022)'nin çalışmasında, *H.perforatum*, povidon iyot, tentür benzoin ve tretinoin gibi farklı ajanların yara iyileşmesi üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, her bir ajanın yara iyileşme sürecine olan etkileri histopatolojik ve biyokimyasal analizlerle incelenmiştir. *H.perforatum*'un antienflamatuar ve epitelizasyonu destekleyici özellikleriyle yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Povidon iyot, antiseptik özellikleri sayesinde enfeksiyon riskini azaltırken, tentür benzoin'in yara bölgesinde koruyucu bir bariyer oluşturarak iyileşmeyi desteklediği belirlenmiştir. Tretinoin ise, hücre yenilenmesini teşvik ederek yara iyileşme sürecine katkıda bulunmuştur. Çalışmada değerlendirilen tüm ajanların yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olduğu, ancak her birinin farklı mekanizmalarla bu süreci desteklediği tespit edilmiştir. Bu çalışmalar, *H.perforatum* 'un bilinen yara iyileştirici etkisinin kombine bir etkin madde ile birleştirildiğinde yara iyileşmesinde daha olumlu etkilerin olabileceğini göstermektedir.

1.7.2. Bor Türevleri

Bor, dünya rezervlerinin %73,5'inin Türkiye'de bulunması ve cam, tarım, savunma, sağlık endüstrisi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılması yönüyle önemli bir elementtir (Aydın vd., 2016; Demirci vd., 2016; Demirci vd., 2015). Bitki hücre duvarı yapısı ve fonksiyonunda, aynı zamanda insan metabolizmasında ve beslenmesinde de önemli roller üstlenmektedir. Doğada yaklaşık 230 farklı türü bulunan bor minerali, metal ve ametallerle oluşturduğu bileşiklerin benzersiz özellikleri sayesinde endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılmaktadır (Topuz, 2016). Borik asit'in, antiseptik ve antiviral özellikleri sayesinde ağız gargaraları, göz damlaları, deri losyonları ve kozmetik ürünler gibi farmasötik formülasyonlarda kullanımı yaygındır. Ayrıca derin yara tedavilerinde de borik asit çözeltileri etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Ahtaz vd., 2019; Alencar de Queiroz vd., 2006; Benderdour vd., 1998; Demirci vd., 2016; Demirci vd., 2015; Dogan vd., 2014; Roy vd., 2010; Sayin vd., 2016; Soriano-Ursua vd., 2014; Soriano-Ursúa vd., 2025; Şen vd., 2019). Borik asit'in fizikokimyasal özellikleri Çizelge 1.3.'te gösterilmektedir.

Çizelge 1.3. Borik asit'in fizikokimyasal özellikleri (Crapse ve Kyser, 2011; USP44)

		$\begin{array}{c} \text{HO} \\ \diagdown \\ \text{B} - \text{OH} \\ \diagup \\ \text{HO} \end{array}$
Kapalı formül	:	H ₃ BO ₃
Kimyasal okunuşu	:	Orthoboric acid
Molekül ağırlığı	:	61,83 g/mol
Organoleptik özellikleri	:	Kokusuz, renksiz veya beyaz, dokunulduğunda hafif kaygan, biraz sedefli parlak pullu veya kristal toz
Çözünürlük	:	Suda ve alkolde çözünür; kaynar suda ve gliserolde (%85) serbestçe çözünür
Erime sıcaklığı	:	170,9°C
Saklama koşulları	:	Sıkıca kapalı, kuru, iyi havalandırılan bir yerde saklanmalıdır.

Bu tez çalışmasında borik asit yüklü film hazırlanması planlandığından, etkin madde miktar tayini çalışmaları incelenmiş, bor türevlerinin tayini için spesifik reaktiflerin kullanımına dayalı UV-spektrofotometrik yöntemin kullanıldığı tespit edilmiştir (Endo vd., 2013; Koseoglu ve Kolak, 2010; Matoh vd., 1997; Mohammed vd., 2014; Rao ve Aggarwal, 2008; Sah ve Brown, 1997; Sarkar ve Singh, 2018). Bu yöntem kolorimetrik ve florimetrik olmak üzere iki kategoriye ayrılmıştır. *Kolorimetrik yöntemde*, renkli bor kompleksleri oluşturmak için çözeltideki bor ile reaksiyona giren reaktifler kullanılır. Oluşan kompleksler, emilen ışık miktarının renk özelliklerine eşdeğer bir dalga boyu sergiler. Bu bağlamda yaygın olarak kullanılan reaktifler sırasıyla yaklaşık 550, 605 ve 410 nm dalga boyuna sahip Kurkumin, Karmin ve Azometin-H'dir. *Florimetrik yöntem* ise bor ile reaktifler arasındaki reaksiyon sonrası floresan bileşiklerin oluşumunu ve miktar tayinini içerir. Kromotropik asit ve Alizarin Kırmızısı sık kullanılan florimetrik reaktiflerdir.

Bor tayininde en yaygın kullanılan spektrofotometrik yöntem, basit, hızlı, hassas ve diğer kimyasal türlerle en az etkileşime sahip olması nedeniyle Azometin-H ile kompleks oluşturmaya dayalı kolorimetrik yöntemdir. Uehara vd. (2001)'nin çalışmasında Azometin-H yöntemiyle kompleks oluşturarak borun HPLC ile 420 nm'de analiz edilebildiği gösterilmiştir. Mohammed vd. (2014)'nin çalışmasında da Azometin-H kullanılarak suda eser miktarda bor miktarının 400-430 nm dalgaboyu aralığında UV spektrofotometrik olarak hızlı bir şekilde ölçülebileceği gösterilmiştir.

FT-IR spektrumu, borik asit içeriğindeki fonksiyonel gruplara özgü karakteristik piklerin belirlenmesini sağlamaktadır. Literatürde 3392 cm^{-1} (O-H gerilme titreşimleri), 1436 cm^{-1} (B-O gerilim bandı), 1192 cm^{-1} (B-O-H düzlemi bandı) ve $883,26\text{ cm}^{-1}$ 'de (simetrik B-O gerilmesi) elde edilen bantlarla borik asit karakterize edilmiştir (Özdemir ve Keskiner, 2018). Ayrıca Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) taramalarında ise iki endotermik pik ile karakterize edilmektedir (Saidaminov vd., 2012; Y. Wu vd., 2017).

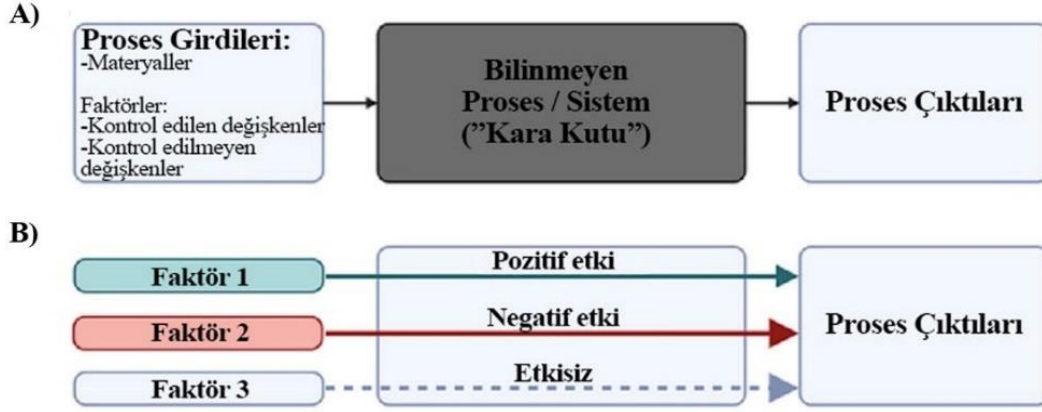
Literatürde, bor türevlerinin yalnızca antimikrobiyal değil, aynı zamanda yara iyileştirici etkilerinin de olduğu bildirilmektedir. Sodyum pentaborat pentahidrat içeren karbopol hidrojellerin yanık, eksizyon ve diyabetik yanık yaralarında *in vivo* çalışmalarda iyileştirici etkiler gösterdiği ve borik aside kıyasla daha geniş antibakteriyel etki sağladığı belirtilmiştir (Aysan vd., 2017; Demirci vd., 2016; Demirci vd., 2015; Dogan vd., 2014; Soriano-Ursúa vd., 2025). Ayrıca, bor türevlerinin fibroblast ve keratinosit göçünü artırarak ECM oluşumunu desteklediği ve bu etkilerin antienflamatuvar özelliklerinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (Benderdour vd., 2000; Demirci vd., 2016; Nzietchueng vd., 2002). Borik asit yüklü polietilen süngerlerin fare modellerinde implante edilmesiyle, anjiyojenik faktörlerin salımını artırdığı ve yara iyileşmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Dousset vd., 2002). Ahtaz vd. (2019) kitozan-kolajen hidrojellerde borik asidin anjiyojenik etki yoluyla yara iyileşmesini desteklediğini göstermiştir. Borik asit, granülasyon dokusu oluşumunda kan damarı yapısını güçlendirerek yara iyileşmesine katkıda bulunur. Ancak, yüksek dozda borik aside maruz kalınması durumunda doku degradasyonu ve hemoraji riski ortaya çıkabileceğinden, topikal uygulamalarda doz ayarlamasına özen gösterilmelidir (Benderdour vd., 2000; Dousset vd., 2002).

Bu çalışmalar ışında, antimikrobiyal etkisi, yara iyileşmesine katkısı ve ülkemizin önemli doğal kaynaklarından biri olması nedeniyle formülasyonda kullanılmak üzere Borik asit seçilmiştir.

1.8. Deney Tasarımı (DoE) ve Farmasötik Ürün Geliştirme Sürecindeki Rolü

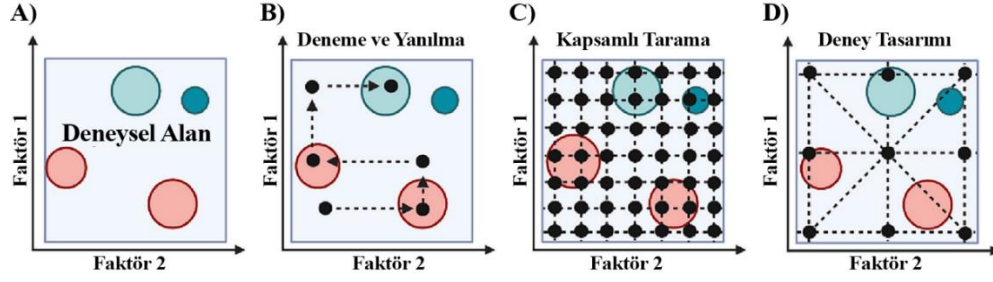
İlaç salım sistemlerinin geliştirilmesi karmaşık ve çok değişkenli olan ve de optimize edilmesi zor bir işlemdir. Optimize bir formülasyona en kısa zamanda ve en az sayıda deneysel çalışma ile ulaşabilmek için deney tasarım modelleri geliştirilmiştir. Özellikle film ve nano/mikropartikül gibi çeşitli ilaç salım sistemlerinin tasarımı, deneysel süreçte kullanılan malzemelere ve üretim parametrelerine bağlı olarak araştırma sonuçlarını doğrudan

etkileyebilecek çok sayıda değişken içerir. Bu süreçte proses çıktısına etkisinin ne olduğu bilinmeyen herhangi bir deneysel faktör "kara kutu" olarak değerlendirilebilir (Şekil 1.9.A) ve optimizasyon işleminin en büyük avantajı ise bu faktörlerin proses çıktısına etkisinin pozitif, negatif veya etkisiz olarak belirlenebilmesidir (Şekil 1.9.B) (Rampado ve Peer, 2023).



Şekil 1.9. Proseslerin veya sistemlerin kara kutu olarak şematik gösterimi (A) ve nihai çıktıdaki faktörlerin farklı etkileri (B) (Rampado ve Peer, 2023).

Bir ilaç şeklinin hazırlanması prosesinde etkili olan iki nicel deneysel faktörün proses çıktısına istenen/istenmeyen etkilerinin tamamı deneysel alan olarak tanımlanabilir (Şekil 1.10.A). Bu deneysel alanda istenen proses çıktıların elde edilebilmesi için, ilaç şeklinin optimizasyonunda ilk deneysel yaklaşım deneme yanılma stratejisidir (Şekil 1.10.B). Bu yöntem, nispeten az sayıda deney gerektirdiğinden uygulanabilirliği yüksektir ve formülasyon üretiminde önemli sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir. Ancak, bazı değişkenlerin diğerlerine kıyasla daha fazla etkili olup olmadığı ve değişkenler arasındaki olası sinerjik veya antagonistik etkileşimler hakkında elde edilen bilgiler kısıtlıdır. Ayrıca nihai formülasyon özellikleri, yalnızca belirlenen deneysel aralık içerisinde anlamlıdır. Deneme-yanılma yaklaşımına alternatif olarak, kapsamlı tarama stratejisi, belirlenen deneysel aralıktaki tüm koşulların sistematik bir şekilde incelenmesini içerir (Şekil 1.10.C). Bu yöntem, süreç hakkında ayrıntılı bilgi edinilmesini sağlamakla birlikte, birkaç değişkenin bile optimize edilmesi için oldukça yüksek sayıda deney gerektirir. Parametre sayısı ve bunların seviyeleri arttıkça, sürecin yürütülmesi katlanarak daha maliyetli ve zaman alıcı hale gelmektedir. Bu durum, elde edilecek optimum sonuçların sağlayacağı faydaların, süreç için harcanan kaynak ve iş gücünün karşılanamayacak bir noktaya ulaşmasına neden olabilir (Rampado ve Peer, 2023).



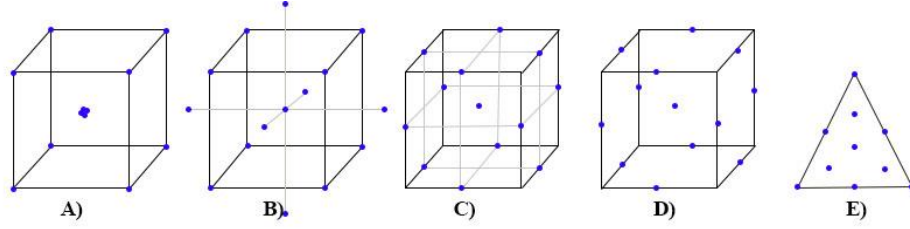
Şekil 1.10. İki nicel deneysel faktör tarafından tanımlanan iki boyutlu deneysel alanın (A), Deneme yanılma deneysel yaklaşımının (B), kapsamlı taramanın (C) ve deney tasarımı (D) şematik gösterimi. (Yüzeydeki kırmızı noktalar istenmeyen çıktı aralıklarını temsil ederken, yeşil noktalar istenen çıktı aralıklarını temsil ederken, koyu yeşil daire optimum faktör kombinasyonunu temsil eder. Siyah noktalar koordinatlar olarak belirli faktöriyel değerler tarafından tanımlanan deneysel bir çalışmayı temsil eder) (Rampado ve Peer, 2023).

İstenen proses çıktılarının elde edilebilmesi için, ilaç şeklinin optimizasyonunda kullanılan diğer yöntem ise Deney Tasarımı (Design of Experiments, DoE)'dir (Şekil 1.10.D). DoE, bilimsel ve istatistiksel ilkeler temelinde deneylerin planlanmasını, uygulanmasını ve analiz edilmesini sağlayarak girdiler ile çıktılar arasındaki ilişkileri anlamaya olanak tanıyan istatistiksel yöntemlerden biridir. DoE'nin sağladığı sistematik analiz yaklaşımı, hedeflenen çıktıya ulaşmak için kritik olmayan parametrelere odaklanmayı azaltırken, istenilen kaliteyi elde etmek için gerekli olan kritik parametrelere daha fazla odaklanılmasını sağlar. Geleneksel olarak tek değişkenin test edildiği deneylerin anlaşılması kolay olmasına rağmen, DoE daha kesin sonuçlar sunar ve "deneysel hatanın" öngörülmesine olanak tanır (Beg vd., 2019; Diwan vd., 2021; Kasinathan vd., 2016; Rampado ve Peer, 2023).

DoE, deneylerin istatistiksel olarak en uygun şekilde planlanmasını sağlayarak bağımsız değişkenler (girdi faktörleri) ile bağımlı değişkenler (yanıtlar) arasındaki etkileşimi belirler. Regülasyon ve kalite güvencesi açısından, ICH Q8 (Farmasötik Geliştirme), Q9 (Kalite Risk Yönetimi) ve Q10 (Farmasötik Kalite Sistemi) kılavuzlarında yer alan "Quality by Design (QbD)" yaklaşımı ile ürün kalitesinin sürekliliği sağlanırken de DoE yaklaşımından yararlanılmaktadır (Beg vd., 2019; Rampado ve Peer, 2023).

Yanıt Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology, RSM), risk değerlendirmesi ve/veya tarama çalışmaları sonucunda belirlenen faktörlerin optimizasyonu için özel olarak kullanılan DoE tasarımıdır. Bu tasarım, faktörlerin ana etkilerini ve etkileşimlerini belirlemek için istatistiksel olarak yeterli olacak sayıda deneysel koşul sağlar. Başlıca RSM modelleri Tam Faktöriyel Tasarım (Full Factorial Design, FFD), Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design, CCD), Box-Behnken Tasarımı (Box-Behnken

Design, BBD), Optimal Tasarım (Optimal Design) ve Karışım Tasarımları (Mixture Designs) olarak listelenebilir (Şekil 1.11.) (Beg vd., 2019; Patel vd., 2022).



Şekil 1.11. Yanıt yüzey tasarımlarının görselleştirilmiş örnekleri. (A) Tam Faktöriyel Tasarım, (B) Merkezi Bileşik Tasarım (CCD), (C) Box-Behnken Tasarımı (BBD), (D) Optimal Tasarım ve (E) Karışım Tasarımı ((Beg vd., 2019)'dan uyarlanmıştır)

FFD, tüm olası faktör kombinasyonlarını test ederek en kapsamlı analiz sağlar. İki veya daha fazla faktörden oluşan ve her faktörün belirli seviyelerde değerlendirildiği bir deney planıdır. Bu tasarım X^k ile ifade edilir; burada X faktör sayısını, k ise her faktör için belirlenen seviyeleri göstermektedir. Ancak, faktör sayısının artmasıyla birlikte deney sayısı üstel olarak arttığı için büyük ölçekli çalışmalarda uygulanabilirliği sınırlıdır (Beg vd., 2019; Tavares Luiz vd., 2021).

CCD, doğrusal olmayan etkileşimleri modellemek için kullanılan en yaygın deney tasarımlarından biridir. Faktöriyel noktalar, merkez noktalar ve eksenel noktalar içeren bir yapıya sahiptir. Bu yöntem, ikinci dereceden (kuadratik) modeller oluşturarak üç seviyeli tam faktöriyel deneyler gerektirmeden çalışılmasını sağlar. Faktöriyel tasarım doğrusal etkileri ortaya koyarken, CCD tasarımı RSM grafiği oluşturmak için elde ettiği kuadratik modeller ile deney tasarım alanını genişleterek optimizasyon sağlar (Beg vd., 2019; Patel vd., 2022; Sadoun-Daikha vd., 2021; Tavares Luiz vd., 2021).

BBD, bağımsız bir ikinci dereceden tasarım olup, içine gömülü bir faktöriyel tasarım veya tam faktöriyel deney seti içermez. Bu tasarımda, deney kombinasyonları tasarım alanının kenar noktalarının orta noktalarına ve merkeze yerleştirilir. BBD, daha az deney gerektirmesi ve tasarımın simetrik olarak döndürülebilir olması nedeniyle optimizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, CCD'ye kıyasla ortogonal bloklama kabiliyeti sınırlıdır, ancak ikinci dereceden modellerin oluşturulmasında güçlü bir alternatiftir (Beg vd., 2019; Diwan vd., 2021; Tavares Luiz vd., 2021).

DoE'nin başarılı bir şekilde uygulanması için belirli adımları takip etmek gereklidir. İlk olarak, çalışmanın amacı açıkça tanımlanmalı ve araştırılacak faktörler ile yanıt değişkenleri

belirlenmelidir. Hangi değişkenlerin deneysel süreçte kritik rol oynadığını anlamada faktörler ile yanıt değişkenleri arasındaki nedensel ilişkilerin belirlenmesi önemli bir adımdır. Üçüncü aşamada, deneyde değerlendirilecek faktörler seçilmeli ve bunların değişim aralıkları belirlenmelidir. Bu aşamayı, yanıt değişkenlerinin seçimi takip eder. Deneyde ölçülecek çıktılar doğru bir şekilde seçilmeli ve ölçüm yöntemleri tanımlanmalıdır. Deneyin beşinci adımı, uygun deney tasarım yönteminin seçilmesidir. FFD, CCD veya BBD gibi uygun bir deney tasarımı belirlenerek çalışma süreci şekillendirilir. Belirlenen tasarım doğrultusunda deneyler gerçekleştirilir, deneylerden elde edilen veriler analiz edilir ve matematiksel modellemeye tabi tutulur. Modelleme sonuçlarına dayalı olarak en uygun faktör seviyeleri belirlenir. Son olarak, deney sonuçlarının doğrulanması gerçekleştirilerek tekrarlı deneyler ile süreç güvence altına alınır. RSM içinde yaygın olarak kullanılan istenirlik fonksiyonu (desirability function) ile farklı yanıt değişkenlerinin hedeflenen değerlere ulaşma derecesi 0 (hiç istenmeyen) ile 1 (tam istenen) arasında bir skalada değerlendirilir (Beg vd., 2019; Rampado ve Peer, 2023).

Farmasötik alanda kullanılan çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerin üretiminde DoE ile çalışılmış araştırmalar bulunmaktadır. Polimerik nanopartiküllerde, polimer, yağ ve yüzey aktif madde miktarı, etkin madde konsantrasyonu, etkin madde/polimer oranı, sulu ve organik faz hacimleri, karıştırma hızı ve süresi, homojenizasyon hızı, santrifüjleme süresi ve hızı, sonikasyon süresi ve frekansı gibi faktörlerin etkisini incelemek için birçok DoE türü uygulanmıştır ve nanopartikül üretimi optimize edilmiştir. Literatüre göre, polimerik nanopartiküllerin birçok bağımlı değişkeni incelenmiştir; bunlar arasında ortalama partikül boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, etkin madde yükleme kapasitesi ve etkin madde salım hızı bulunmaktadır. Bunların dışında SPAN, pH ve yüzey alanı gibi polimerik nanopartikül hazırlamada yer alan diğer parametreler de değerlendirilebilmektedir (Abosabaa vd., 2021; Akmal Johari vd., 2024; Arora vd., 2011; Diwan vd., 2021; Haider vd., 2021; Kasinathan vd., 2016; Patel vd., 2022; Ribeiro vd., 2013; Sathyamoorthy vd., 2017; Tavares Luiz vd., 2021). Akmal Johari vd. (2024), emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile *Acalypha indica* ekstresi yüklü kitozan-PCL mikropartiküllerin optimizasyonunda tek faktörlü deneysel tasarım ve CCD tasarım yöntemlerini karşılaştırmışlardır. CCD kullanılarak elde edilen mikroenkapsülasyon koşulları, tek faktörlü deneysel tasarım yöntemine kıyasla daha yüksek enkapsülasyon etkinliği ve daha kontrollü partikül boyutu dağılımı sağlamıştır.

DoE yöntemleri, film özelliklerinin iyileştirilmesi ve istenilen farmasötik performansın elde edilmesi açısından önemli bir optimizasyon aracıdır (Cao vd., 2025; Dinh vd., 2024; Sagioglu vd., 2021). Singh vd. (2015), kitozan bazlı yenilebilir filmlerin geliştirilmesinde BBD kullanarak kitozan konsantrasyonu, gliserol miktarı ve kurutma sıcaklığı gibi üç bağımsız değişkenin etkilerini değerlendirmiştir. Film kalınlığı, nem içeriği, çözünürlük, renk parametreleri, gerilme direnci, yoğunluk, ışık geçirgenliği ve su buharı geçirgenlik hızı gibi çok sayıda bağımlı değişken bu kapsamda analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda, kitozan konsantrasyonunun film özellikleri üzerinde genel olarak anlamlı etkiler oluşturduğu, gliserol miktarının yoğunluk üzerinde ters yönlü etkili olduğu ve kurutma sıcaklığının gerilme direnci özellikleri üzerinde belirleyici olduğu görülmüştür. Optimum film formülasyonu, %2,0 kitozan, %0,75 gliserol ve 40°C kurutma sıcaklığı olarak tanımlanmıştır. Bukkal yolla uygulanan bir film çalışmasında ise, Mortazavian vd. (2014), tiyolatlı dimetil etil kitozan türeviden hazırlanan insülin yüklü nanopartikülleri kitozan bazlı filmlere yükleyerek bu sistemin biyoadezyon ve mekanik performansını CCD ile optimize etmişlerdir. Bağımsız değişken olarak kitozan ve gliserol oranları değerlendirilmiş; yanıt değişkenleri ise gerilme direnci ve biyoadezyon kuvveti olarak belirlenmiştir. Optimum formülasyon, %4 kitozan ve %10 gliserol ile elde edilmiş ve 5,81 kg/mm² gerilme direnci ile 2,47 N biyoadezyon kuvveti sağlanmıştır. Sasikala vd. (2018), kitozan ve manuka balı içeren yara örtüsü formülasyonlarının üretim koşullarını optimize etmiş ve kitozan, bal ve plastizer konsantrasyonlarının, gerilme kuvveti, elastikiyet, su buharı geçirgenliği ve biyoadezyon üzerindeki etkilerini RSM ile analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda %2 kitozan, %13 manuka balı ve %0,75 plastizer oranı ile hazırlanan filmlerin, mekanik dayanıklılık ve nem dengesini sağlayan ideal bir yara örtüsü profili sunduğu raporlanmıştır. Sonuç olarak günümüze kadar yapılan çalışmalar, DoE kullanımının uygun istatistiksel yöntem, faktör veya değişken ve faktör seviyeleri seçilirse avantajlı olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, biyobozunur polimerlerle yaralı bölgeye topikal olarak uygulanabilen, bu etkin maddeleri içeren bir ilaç şekli geliştirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde *H.perforatum* ekstre ve bileşenleri ile boru bir arada içeren partiküler ilaç sistemi ve film yara örtüsü çalışması bulunmamaktadır. Bu amaç doğrultusunda, etkin madde salımının modifiye edilmesi ve stabilite problemlerinin aşılması için hiperisin standardize *H.perforatum* ekstresinin nanopartiküler sistem haline getirilmesi, eş zamanlı olarak çalışılması düşünülen polimerler ile biyoadeziv film formülasyonlarının çözücü dökme yöntemi ve 3B baskı yöntemi ile hazırlanması ve ideal film formülasyonlarının seçilmesi, her iki etkin maddenin seçilen film formülasyonu içerisine yüklenmesi ve optimize edilen formülasyonun *in vivo* çalışmalarla yara

iyileşmesindeki etkisinin tespit edilmesi sonucunda, 3B baskı ile hastaya özgü, yaraların boyutuna uygun yara örtülerinin hazırlandığı yeni ve güncel bir ilaç şeklinin geliştirilmesi düşünülmüştür.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum asetat	Isolab Chemicals, Türkiye
Aseton	Sigma Aldrich, ABD
Asetonitril	Sigma Aldrich, ABD
Askorbik asit	Sigma Aldrich, Çin
Azometin-H	Merck, Almanya
Borik asit	Boren, Türkiye
Diklorometan	Sigma Aldrich, ABD
Disodyum hidrojen fosfat	Sigma Aldrich, ABD
Etanol (Farmasötik grade)	Carlo Erba, Almanya
Etil asetat (HPLC Grade)	Carlo Erba, Almanya
Fibroblast Basal Medium	ATCC, Almanya
Glasiyel asetik asit	Riedel-de Haen, Almanya
Gliserol	Riedel-de Haen, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich, ABD
Hiperisin from Hypericum perforatum	Cayman, Almanya
Kitozan-Düşük molekül ağırlıklı	Sigma Aldrich, ABD
Kitozan-Orta molekül ağırlıklı	Sigma Aldrich, ABD
L929 fare fibroblast hücresi	ATCC, Almanya
Metanol (HPLC Grade)	Merck, Almanya
Mikrofil	Microfil, ABD
Müsin	Carl Roth, Almanya
Na ₂ EDTA	Sigma, Almanya
Ortofosforik asit	Aklar Kimya, Türkiye
Polikaprolakton, ortalama MA: 80,000	Aldrich, Birleşik Krallık
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Potasyum hidroksit	Merck, Almanya
Primer Dermal Fibroblast Hücresi, (Normal, Human, Adult)	ATCC, Almanya

Propilen glikol	Aklar Kimya, Türkiye
Psödohyperisin	Cayman, Almanya
PVA (Mowiol 4-88, MW:31,000)	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum klorür	Kimetsan, Türkiye
Staphylococcus aureus (ATCC®25923™)	ATCC, Almanya
Escherichia coli (ATCC®25922™)	ATCC, Almanya

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

24 kuyulu hücre kültürü plağı	Greiner, Almanya
3B Baskı Cihazı (Axo A1)	Axolotl, Türkiye
Çalkalayıcı inkübatör (MaxQ Mini 4450)	Thermo Scientific, ABD
Derin dondurucu (-40°C)	Heto, Almanya
Derin dondurucu (-70°C)	Scancool, Almanya
Diferansiyel Tarama Kalorimetresi	Shimadzu (DSC 60), Japonya
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi	Shimadzu FTIR-8040, Japonya
Hassas terazi	Sartorius (BL 210S), Almanya
Homojenizatör (Ultra Turrax T25)	IKA, Almanya
HPLC kolonu, C18, 5 µm, 150x4,6 mm	ACE (5 C18), İskoçya
Liyofilizatör (Toros TRST 4/4 DS)	Teknosem, Türkiye
Manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific, Güney Kore
Mikro-bilgisayarlı tomografi (SkyScan 1275)	Bruker, Belçika
Mikrometre	NSK, Japonya
Mikropipet	Isolab, Türkiye
Partikül büyüklüğü analizi cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
Petri kutusu PTFE 60x15 mm	Microcult, Almanya
pH metre	Mettler Toledo, İsviçre
Prob sonikatör (SonoPuls HD 2070)	Bandelin, Almanya
SEM kaplama cihazı	Gatan, ABD
SEM Quanta 400F Field Emission	Thermo Fisher Scientific-FEI, Almanya
Tekstür analiz cihazı (TA-XT Plus)	Stable Micro Systems, Birleşik Krallık
Ultrasantrifüj (Sigma 3–30 KS)	Sigma, Almanya
UV-Vis Spektrofotometre (Evolution 201)	Thermo Scientific, Almanya
Vial Amber (1,5 ml, 11,6*32 mm), kapaklı	S&H Labware, Almanya

Vorteks cihazı	Reax Top, Heidolph, Almanya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Agilent (1100 series), ABD
Zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, İngiltere

2.2. Yöntemler

2.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Tamponlar

Borik asit'in spektrofotometrik analizini yapmak için pH 5,2 tampon çözeltisi ve Azometin-H renk çözeltisi kullanılmıştır (Endo vd., 2013; Koseoglu ve Kolak, 2010; Matoh vd., 1997; Mohammed vd., 2014; Rao ve Aggarwal, 2008; Sah ve Brown, 1997). İçerikleri aşağıda yer almaktadır:

pH 5,2 amonyum asetat tamponu içeriği:

Amonyum asetat.....	50,0 g
Glasiyel asetik asit.....	25,0 ml
Na ₂ EDTA.....	1,4 g
Saf su.....	100 ml

Hazırlanışı: 100 ml saf su içerisine 50,0 g amonyum asetat eklenmiş, amonyum asetat çözündükten sonra 25 ml glasiyel asetik asit ve 1,4 g Na₂EDTA ilave edilmiştir. Ardından hidroklorik asit ile pH'sı 5,2'ye ayarlanmıştır.

Azometin-H renk çözeltisi içeriği:

Azometin-H.....	0,5 g
Askorbik asit.....	1,0 g
Saf su.....	50 ml

Hazırlanışı: 50 ml saf su içerisine 0,5 g Azometin-H ve 1,0 g Askorbik asit çözölmüştür. Kullanılncaya kadar ışık almayacak şekilde karanlık ortamda ve buzdolabında saklanmıştır.

In vitro salım ortamında yapay yara sıvısı olarak pH 7,4 fosfat tamponu (PBS; Phosphate-buffered saline) kullanılmıştır (USP44).

pH 7,4 fosfat tamponu içeriği:

Disodyum hidrojen fosfat.....2,38 g
Potasyum dihidrojen fosfat.....0,19 g
Sodyum klorür.....8,00 g
Sodyum azid.....0,1 g
Distile su.....ym.....1000 ml

Hazırlanışı: 2,38 g disodyum hidrojen fosfat, 0,19 g potasyum dihidrojen fosfat, 8 g sodyum klorür tartılmış ve balon jojede 1000 ml'ye distile su ile tamamlanarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Daha sonra, 0,1 g sodyum azid çözünme ortamında mikroorganizma oluşmasını önlemek için eklenmiştir. Son olarak, ortofosforik asit ile pH 7,4'e ayarlanmıştır.

2.2.2. *H.perforatum*'un Standardının Çeşitli Çözünme Ortamlarındaki Analizleri

2.2.2.1. *H.perforatum*'un Standardının UV-Vis Spektrofotometre ile Miktar Tayini ve Metanol Çözeltilisinde Kalibrasyonu

H.perforatum ekstresinin total hiperisin içeriği bakımından farmakopeye uygunluk analizi için UV spektrofotometre yöntemi seçilmiş ve elde edilen kalibrasyon denklemi bitki ekstresindeki total hiperisin tayininde kullanılmıştır.

Total hiperisin tayini için standart olan hiperisinin metanolde (100 µg/ml) stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından 1:10 seyreltilen çözeltinin 400-650 nm aralığında UV-Vis spektrofotometre (Thermo Scientific, Evolution 201, Almanya) ile spektrumları alınmıştır. Absorbansın maksimum olduğu dalga boyu tespit edilmiştir. Seyreltme yapılarak 8 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmış ve 588 nm'de analiz gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyona karşı elde edilen absorbans verileriyle kalibrasyon grafiği çizilerek doğru denklemleri hesaplanmıştır.

2.2.2.2. *H.perforatum*'un Standardının HPLC Yöntemi ile Analiz Metodunun Geliştirilmesi

Yöntem belirlenmesi için pek çok ön çalışma yapılmış ve *H.perforatum* ekstresinden hiperisinin tayini için çözücü olarak metanol ortamı tercih edilmiştir (Ali vd., 2018; Brolis vd.,

1998; Dikmen vd., 2011; Koyu ve Haznedaroglu, 2015; Lyles vd., 2017; Orhan vd., 2013; Reyes ve Koda, 2001; Yucel vd., 2017). Elde edilen verilerden yola çıkarak EP10'da yer alan HPLC yöntemi modifiye edilmiştir. Mobil fazı oluşturan solvanların farklı oranları, enjeksiyon hacmi, akış hızı gibi parametreler değiştirilerek uygun ve kısa alıkonma süresinde kromatogram veren HPLC (Agilent 1100 series, ABD) metodu geliştirilmiştir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Hiperisinlerin metanol ortamında HPLC yöntemi parametreleri

Mobil faz	: Etilasetat: Metanol: Fosfat tamponu (pH 2,0) (26:66:8 h/h/h)
Akış hızı	: 1 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	: 20 µl
Kolon	: ACE5 C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm)
Dedektör	: 590 nm
Sıcaklık	: 20°C
Alıkonma Zamanı	: 2,0 dk (Psödohiperisin); 3,7 dk (Hiperisin)

2.2.2.3. *H.perforatum*'un Standardının HPLC Yöntemi ile *In Vitro* Çözünme Ortamında ve Metanol Çözeltilisinde Miktar Tayini ve Kalibrasyonu

Ekstredeki Hiperisin ve psödohiperisin tayini için standart maddelerin metanolde (100 µg/ml) ve *in vitro* çözünme ortamında (PBS pH 7,4: etanol 3:1) stok çözeltisi hazırlanmıştır (100 µg/ml). Her iki çözünme ortamı için de 7 farklı konsantrasyonda (1 µg/ml - 8 µg/ml) hazırlanan çözeltilerin 590 nm'deki absorbans verileri tespit edilerek kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve doğru denklemleri elde edilmiştir. Metanol ortamında elde edilen denklem bitki ekstresindeki Hiperisin ve Psödohiperisin miktarının tayininde ve nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğinin tayininde, *in vitro* çözünme ortamında elde edilen denklem ise etkin maddenin çözünme ortamındaki miktar tayininde kullanılmıştır.

2.2.3. Borik Asit'in UV-Vis Spektrofotometre ile Miktar Tayini

Bor tayininde en yaygın kullanılan spektrofotometrik yöntem olan basit, hızlı, hassas ve diğer kimyasal türlerle en az etkileşime sahip olması nedeniyle Azometin-H ile kompleks oluşturmaya dayalı kolorimetrik yöntem kullanılmıştır (Endo vd., 2013; Mohammed vd., 2014). Borik asitin filminden kantitatif miktar tayininin yapılabileceği çözücü olarak %1,5 (h/h) sulu asetik asit ortamı (Ahmed vd., 2009) ve *in vitro* salım tayininin yapılacağı ortam olarak hiperisinlerde olduğu gibi PBS (pH 7,4) ortamı tercih edilmiştir.

2.2.3.1. Borik Asit'in *In Vitro* Çözünme Ortamında ve %1,5 (h/h) Sulu Asetik Asit Çözeltisinde UV-Vis Spektrofotometrik Yöntem ile Kalibrasyonu

Borik asit tayini için standart maddenin %1,5 (h/h) sulu asetik asit ortamında ve PBS ortamında (1000 µg/ml) stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından belli oranda seyreltilen çözeltinin 1 ml'sine 0,25 ml pH 5,2 tampon çözeltisi ve 0,25 ml azometin-H çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırılmış ve en az 45 dk karanlık ortamda bekletilmiştir. Benzer şekilde çözücü ortamın 1 ml'sine 0,25 ml tampon çözeltisi ve 0,25 ml azometin-H çözeltisi ilave edip karıştırılarak, en az 45 dk karanlık ortamda bekletilerek kör çözeltisi hazırlanmıştır. 400-650 nm aralığında UV-Vis spektrofotometre (Thermo Scientific, Evolution 201, Almanya) ile köre karşı spektrumları alınmış ve maksimum absorbans verdiği dalga boyu bulunmuştur. 2 µg/ml ile 8 µg/ml arasındaki derişimlere seyreltme yapılarak 7 farklı konsantrasyonda (2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml ve 8 µg/ml) çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin 1'er ml'sine 0,25 ml renk çözeltisi ve 0,25 ml tampon çözeltisi ilave edilip karıştırılarak en az 45 dk karanlık ortamda bekletilerek analiz edilmiştir. Okunan absorbans değerleriyle bulunan kalibrasyon grafikleri çizilerek elde edilen doğru denklemleri film formülasyonlarında ve *in vitro* çözünme ortamında kantitatif borik asit miktar tayininde kullanılmıştır.

2.2.4. Etkin Maddelerin Miktar Tayininde Kullanılan Analitik Yöntemlerin Validasyonu

Geliştirilmesi planlanan analitik uygulamalar için analitik yöntemin amaca uygun olup olmadığının belirlenmesi için yapılan laboratuvar çalışması ve deneyler, analitik yöntem validasyonu olarak tanımlanmaktadır. Etkin madde miktar tayininin performansını değerlendirmek için kullanılan deneysel validasyon yöntemleri aşağıda açıklanmıştır (ICH-Q2(R1), 2005; USP44, 2021).

2.2.4.1. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntem kullanılarak elde edilen test sonuçlarının gerçek veya kabul edilen referans değere yakınlığının ölçüsü olarak tanımlanır. Yani teorik olarak bilinen değerlerle pratik olarak uygulamada elde edilen değerlere yakınlığının tespitini sağlar. Değerlendirme sürecinde, bilinen miktardaki etkin maddenin analiz edilmesiyle elde edilen % geri elde değerleri bulunarak hesaplanır. Belirli aralığı kapsayan en az üç farklı

konsantrasyon noktasında her biri en az üçer kez hazırlanan örneklerin yüzde geri eldelerinin hesaplanması ile belirlenir (ICH-Q2(R1), 2005; USP44, 2021).

Hiperisin ve Psödohiperisin'in HPLC yöntemiyle **metanol ortamında** 0,1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, üç farklı konsantrasyondaki (hiperisin için 2µg/ml, 5µg/ml, 7µg/ml; psödohiperisin için 2µg/ml, 4µg/ml, 7µg/ml) üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. **In vitro çözünme ortamındaki** hiperisin tayini için hiperisinin 0,1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 3µg/ml, 5µg/ml, 8µg/ml konsantrasyondaki üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltiler belirlenen HPLC yöntemi kullanılarak 6'şar kere analiz edilmiştir. Elde edilen alan verileri yardımıyla pratik konsantrasyon, ortalama % Geri Elde, Standart Sapma (SS) ve % Bağlı Standart Sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır.

UV-Vis spektrofotometre yöntemiyle hiperisin olarak total hiperisin tayini için **metanol ortamında** hiperisinin 0,1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 2µg/ml, 5µg/ml, 8µg/ml konsantrasyondaki üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltiler UV spektrofotometre kullanılarak 6'şar kere analiz edilmiştir. Elde edilen absorbans verileri yardımıyla pratik konsantrasyon ve ortalama % Geri Elde, Standart Sapma (SS) ve % Bağlı Standart Sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır.

%1,5 (h/h) sulu asetik asit ortamındaki borik asit tayini için borik asitin 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 3µg/ml, 5µg/ml, 8µg/ml konsantrasyondaki üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. **PBS ortamındaki** borik asit tayini için borik asitin 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 3µg/ml, 5µg/ml, 7µg/ml konsantrasyondaki üç farklı çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltiler UV spektrofotometre kullanılarak 6'şar kere analiz edilmiştir. Elde edilen absorbans verileri yardımıyla pratik konsantrasyon ve ortalama % Geri Elde, Standart Sapma (SS) ve % Bağlı Standart Sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır.

2.2.4.2. Kesinlik

Aynı homojen numuneden alınan birden fazla örnekle yapılan ölçümler arasındaki uyum, analitik yöntemin kesinliği olarak tanımlanmaktadır. Bu kavram, yöntemin normal koşullar altında tutarlılık gösterip göstermediğini değerlendirmek için kullanılır. Kesinlik; tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve laboratuvarlar arası tekrar edilebilirlik olmak üzere üç ana bileşen üzerinden incelenir (ICH-Q2(R1), 2005).

- *Tekrarlanabilirlik*; kısa zaman aralıklarında aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Raporlanabilir aralıkta en az dokuz ölçüm (üç konsantrasyon x üç tekrar) üçer kez veya test konsantrasyonunun %100'ünde en az altı ölçümle belirlenir.
- *Ara kesinlik*; yöntemin kullanılacağı koşullara bağlı olarak farklı günler, farklı çevresel koşullar, farklı analistler, farklı cihazlar gibi laboratuvar içi değişkenleri belirtir. Bu etkilerin her birinin ayrı ayrı incelenmesinin gerekmediği de kılavuzda belirtilmiştir.
- *Tekrar elde edilebilirlik*; birden fazla laboratuvarda yapılan kesinlik çalışmalarıdır.

Hiperisin ve Psödohiperisin'in HPLC yöntemiyle metanol içindeki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için; üç farklı konsantrasyonda (hiperisin için 2µg/ml, 5µg/ml, 7µg/ml; psödohiperisin için 2µg/ml, 4µg/ml, 7µg/ml) çözeltileri hazırlanmıştır. *In vitro* salım ortamındaki hiperisinin HPLC yöntemiyle miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için; 2µg/ml, 5µg/ml, 8µg/ml konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin belirlenen HPLC yöntemi ile art arda 6 defa analizleri yapılarak konsantrasyonlara karşılık gelen alan değerleri ve pratik konsantrasyonları bulunmuştur.

UV-Vis spektrofotometre yöntemiyle hiperisin olarak total hiperisinin miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için; 2µg/ml, 5µg/ml, 8µg/ml konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin spektrofotometre ile art arda 6 defa analizleri yapılarak konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri ve pratik konsantrasyonları bulunmuştur.

UV-Vis spektrofotometre yöntemiyle borik asitin %1,5 (h/h) asetik asit içindeki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için; 3µg/ml, 5µg/ml, 7µg/ml konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. UV-Vis spektrofotometre yöntemiyle borik asitin PBS içindeki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğinin belirlenebilmesi için; 3µg/ml, 5µg/ml, 7µg/ml konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerin spektrofotometre ile art arda 6 defa analizleri yapılarak konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri ve pratik konsantrasyonları bulunmuştur.

2.2.4.3. Teşhis Sınırı (DL) ve Tayin Sınırı (QL)

ICH kalite kılavuzunda LOD ve LOQ olarak yer alan terimler, revizyonla birlikte DL ve QL olarak adlandırılmaya başlanmıştır. *Teşhis sınırı (DL)*: Belirli koşullar altında örnek

içinde analiz edilen maddenin algılanabilen ancak tam olarak miktar tayini yapılamayan en düşük miktardır (ICH-Q2(R1), 2005)

$$DL = 3.3 \sigma/S$$

Eşitlik 2.1.

σ : Regresyon doğrularının y eksenini kesen noktalarının standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Tayin sınırı (QL): Belirli koşullar altında örnek içinde analiz edilen maddenin uygun kesinlik ve doğruluk ile kantitatif olarak belirlenebilen en düşük miktardır (ICH-Q2(R1), 2005).

$$QL = 10 \sigma/S$$

Eşitlik 2.2.

σ : Regresyon doğrularının y eksenini kesen noktalarının standart sapması

S: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

2.2.4.4. Doğrusallık

Analitik yöntemde verilen aralık boyunca örnek içindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonu ile elde edilen test sonuçlarının arasında doğrusal ilişki elde edilebilmesidir. Doğrusallığın değerlendirilmesi için analitik yöntemde verilen aralık boyunca en az beş konsantrasyon noktası kullanılarak determinasyon katsayısı, doğrunun y eksenini kestiği kesişim noktası, regresyon doğrusunun eğimi ve regresyon doğrusundan sapma analizi verileri belirlenmelidir (ICH-Q2(R1), 2005). Uygulama aralığı ise örnek içindeki analiz edilen madde için analitik yöntemin uygun kesinlik, doğruluk ve doğrusallığa sahip olduğunun gösterildiği en düşük ve en yüksek konsantrasyonları arasındaki aralıktır.

Hiperisin ve psödohiperisin'in HPLC yöntemiyle metanoldeki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenebilmesi için 1µg/ml ile 8µg/ml aralığında 7 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Hiperisin'in HPLC yöntemiyle PBS içindeki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenebilmesi için 2µg/ml ile 8µg/ml aralığında 7 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve hazırlanan konsantrasyonlara karşılık gelen alan değerleri kullanılmıştır.

Total hiperisin'in spektrofotometre yöntemiyle metanol içindeki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenebilmesi için 1µg/ml ile 9µg/ml aralığında 8 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve hazırlanan konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri kullanılmıştır.

Borik asitin spektrofotometre yöntemiyle %1,5 (h/h) asetik asit ortamı içindeki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenebilmesi için 2µg/ml ile 8µg/ml aralığında 7 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Borik asitin spektrofotometre yöntemiyle PBS ortamı içindeki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenebilmesi için 2µg/ml ile 8µg/ml aralığında 7 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve hazırlanan konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerleri kullanılmıştır.

Geliştirilen etkin madde miktar tayini yöntemlerinin doğrusallık aralığının değerlendirilmesinde İstatistiksel hesaplama ve grafik çizimlerinde GraphPad InStat İstatistik Programı (Version 3.05) kullanılmıştır.

2.2.4.5. Seçicilik

Seçicilik, diğer bileşenlerin varlığından etkilenmeden analiz edilen maddenin analitik yöntem ile tayin edebilmesidir (ICH-Q2(R1), 2005). Seçicilik testi için formülasyondaki etkin maddelerin ve diğer maddelerin (HPLC ve/veya UV-Vis spektrofotometre ile analizinde girişim değerlendirilmesi yapılmıştır.

2.2.5. *H.perforatum*'un Alkollü Ekstresinin Hazırlanması

Soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle etanollü *H.perforatum* ekstreleri hazırlanmıştır. Alkollü ekstre hazırlığı için İyi Tarım Uygulamalarına uygun şartlarda yetiştirilen ve hasat sonrası İyi Tarım Ürün Sertifikasına sahip bitkiler temin edilmiştir. Bitki, Doç. Dr. Sinem ASLAN ERDEM (Farmakognozi Departmanı, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi, Türkiye) tarafından doğrulanmıştır. Bir kupon örneği Doç. Dr. Gülderen YILMAZ tarafından hazırlanmış (Kupon No. 30944) ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmıştır (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Bitki Künyesi

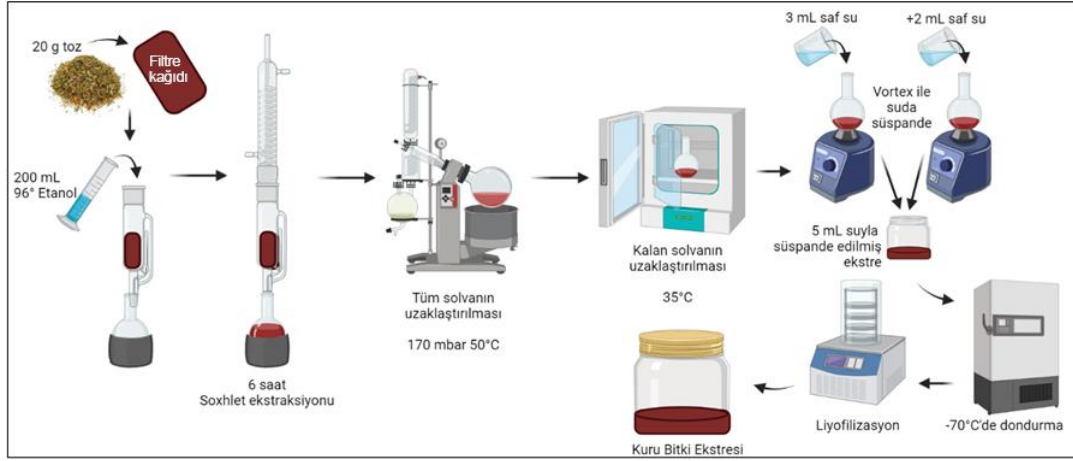
Bitki Adı	: <i>Hypericum perforatum</i> L.
Yetiştirildiği /Toplandığı İl ve İlçe	: Samsun İli Tekkeköy İlçesi Başköy Mahallesi
Toplandığı Yerin Yüksekliği /Rakım	: 500 Rakım
Toplandığı Tarih	: 04 Temmuz 2022
Toplayan Kişi Adı Soyadı	: Okan Kaya (Botafarma Çalışanı)

Çiçekli üst kısımlarından hasat edilmiş olan *H.perforatum* bitki örnekleri oda sıcaklığında 15 gün boyunca kurutulmuştur. Uygun şekilde paketlenerek, oda sıcaklığında ışıktan almayan ortamda saklanmıştır. Kurutulan örnekler, kaba toz halinde öğütülmüştür (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. *Hypericum perforatum* bitkisinin kurutma ve öğütme aşamaları

Ekstraksiyon soxhlet yöntemiyle yapılmıştır. Bunun için 20 g öğütülmüş bitki tozu, filtre kağıdına sarılarak soxhlet aparatına yerleştirilmiştir. 200 ml 96°'lik etanol ile bir kez sifon yaptırıldıktan sonra 6 saat ekstraksiyona bırakılmıştır (Avato ve Guglielmi, 2008; Cossuta vd., 2012). Ekstraksiyon işleminin ardından rotary evaporatörde (Buchi RII, İsviçre) tüm etanol uzaklaştırılmıştır. Kalan solvanı da uzaklaştırmak için ~24 sa 35°C sıcaklıkta vakumlu etüvde kurutulmuştur. Balon dibindeki kuru ekstre saf su ile disperse edilmiş ve liyofilizasyon işlemi öncesi -70°C'de donmaya bırakılmıştır (Scancool, Almanya). Bu işlem 16 kez tekrarlanmıştır. -85°C'de liyofilizatörde (Teknosem TOROS TRST 4/4 DS, Türkiye) liyofilize edilen kuru bitki ekstreleri, kullanıma kadar buzdolabında ağzı kapalı ve ışıktan almayan kaplarda saklanmıştır (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Alkollü bitki ekstresinin hazırlama aşamaları

2.2.6. *H.perforatum*'un Alkollü Ekstresinin Farmakope Standartlarına Uygunluğunun Değerlendirilmesi

2.2.6.1. *H.perforatum*'un Alkollü Ekstresinden UV-Vis Spektrofotometre ile Total Hiperisin Tayini

Soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan kuru ekstrelerdeki total hiperisin tayini spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Bunun için önce kuru ekstrelerin metanol içerisinde belirli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Daha önce kalibrasyonu oluşturulan yöntem ile (Bkz Bölüm 2.2.2.1) 588 nm'de metanol kör çözeltisine karşı 3'er kez absorbansları ölçülmüş ve kalibrasyon denklemi kullanılarak absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar belirlenerek kuru ekstredeki % hiperisin miktarı bulunmuştur.

2.2.6.2. *H.perforatum*'un Alkollü Ekstresinden HPLC Yöntemi ile Hiperisin Tayini

Soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan kuru ekstrelerdeki hiperisin tayini HPLC yöntemi ile belirlenmiştir (Bkz Bölüm 2.2.2.3.). Bunun için önce kuru ekstrenin metanol içerisinde belirli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. 590 nm'de analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramda hiperisin ve psödohiperisin piklerinin yerini tam olarak tespit edebilmek için, hazırlanan bu metanollü ekstre çözeltisine sırasıyla hiperisin ve psödohiperisin standartlarının bilinen miktarları da eklenerek, ekstre kromatogramında görülen piklerin durumları incelenmiştir. Ardından kalibrasyonu oluşturulan yöntem ile 590 nm'de 3'er kez alanları ölçülmüş ve kalibrasyon denklemi kullanılarak alanlara karşılık gelen

konsantrasyonlar belirlenmiş, 16 ekstrenin karışımı ile elde edilen kuru ekstredeki % hiperisin miktarı bulunmuştur.

2.2.7. *H.perforatum*'un Alkollü Ekstresinin Farklı Çözünme Ortamlarında Çözünürlük Çalışması

H.perforatum'un ana bileşenlerinden olan hiperisinin sulu ortam çözünürlüğü düşük olduğu için sürfaktan ve kosolvent kullanımının hiperisinin çözünürlüğüne etkisini görmek ve *in vitro* salım çalışmalarında sink koşulu sağlayabilecek çözünme hacminin belirlenmesi için liyofilize bitki ekstresi kullanılarak 4 farklı ortamda çözünürlük çalışması yapılmıştır. Bunun için PBS (pH 7,4) ortamı, %0,2 h/h Tween 80 içeren PBS ortamı, %25 h/h metanol ve %25 h/h etanol içeren PBS ortamı kullanılmıştır. 25 µg ve 50 µg hiperisine eşdeğer bitki ekstresi 5 ml ortamda 37°C'de 100 rpm hızda inkübatörlü çalkalayıcıda karışmaya bırakılmıştır. 6, 12, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde 1'er ml numune filtre ile çekilerek alınmış, ortamdaki çözünmeden kalan ekstre miktarından kayıp olmaması için alınan numune miktarı kadar aynı sıcaklıktaki taze çözünme ortamı filtreden geri yıkama ile ortama ilave edilmiştir. Analizden önce numuneler 0,45 µm por çaplı filtreden süzülerek 1,5 ml'lik viallere alınmış ve *in vitro* çözünme ortamında miktar tayini için geliştirilen HPLC yöntemi (Bkz Bölüm 2.2.2.3) ile analiz edilmiştir.

2.2.8. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada, en uygun nanopartikül formülasyonunun geliştirilebilmesi için literatür taraması yapılarak, seçilen etkin madde ile polimerlerin özellikleri göz önünde bulundurularak çeşitli ön formülasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte, öncelikle farklı konsantrasyonlarda PCL ile birlikte sürfaktan olarak seçilen PVA kullanılmış ve farklı formülasyon teknikleriyle (karıştırıcı türü, karıştırma hızı vb.) dahil edilmiştir. Elde edilen bu ön formülasyonlar değerlendirilmiş ve karakterizasyon çalışmaları sonucunda farmakope monografına uygunluğu tespit edilen *H.perforatum* ekstresi içeren nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır.

2.2.8.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartikül üretimi için modifiye nanoçöktürme yöntemi kullanılmıştır. Polimer olarak PCL ve organik çözücü olarak aseton ve/veya diklorometan (DCM) kullanılmıştır. Yüzey aktif madde olarak PVA'nın farklı oranlarda sulu çözeltileri hazırlanarak kullanılmıştır. Işıktan bozunma ihtimaline karşı *H.perforatum* ekstresi içeren tüm aşamalarda çalışılan cam kaplar alüminyum folyo ile kapatılarak ışıksız ortamda çalışılmıştır.

Formüller hazırlanırken, su fazı bileşenleri oda sıcaklığında homojen hale gelinceye dek karıştırılmıştır. Öncelikle tartılan PCL'nin kapaklı bir kap içerisinde 60°C'de aseton ve/veya DCM içerisinde karıştırılarak çözünmesi beklenmiştir. Oda sıcaklığına soğuması beklendikten sonra etanolde çözünmüş liyofilize *H.perforatum* ekstresi ilave edilmiş ve homojen oluncaya dek karıştırılarak organik faz hazırlanmıştır. *H.perforatum*'un organik faz içerisinde çökmemesi için ortama etanol de eklenmiştir. Bir beher içerisinde koyulmuş su fazı oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı, homojenizatör ve/veya prob sonikatör ile karıştırılırken, bu sulu faza organik faz ilave edilmiştir. Homojen şekilde emülsiyon oluşumu gerçekleşen formüllerde nanopartikül üretim aşamasına evaporasyon ile devam edilmiştir. Rotavaporda organik solvan uzaklaştırılmış, ardından eşit hacimde bölünerek santrifüj tüplerine aktarılmış ve ağırlıkça birbirine yakın olanlar eşleştirilerek 26.000 rpm'de 60 dk ultrasantrifüj (Sigma 3-30 KS, Almanya) işlemi uygulanmıştır. Süpernatant ayrıldıktan sonra saf su ile süspande edilen partiküller -40°C'de dondurulmuş ve -85°C'de liyofilizatörde liyofilize edildikten sonra buz dolabında saklanmıştır. Ayrıca, santrifüj ile elde edilen süpernatant kısmı HPLC analizlerine tabi tutulmuş ve işlem etkinliği (%EE) analizi gerçekleştirilmiştir (Nafee vd., 2013).

Çeşitli alkollü bitki ekstresi yüklü nanopartikül formülasyonlarına dair literatür taramaları yapılmış ve daha önceki deneyimlerimizden (Geçgel, 2018; Karatas vd., 2009, 2010) hareketle yüzey aktif madde olarak PVA ve organik faz olarak DCM'nin kullanıldığı formülasyon denemeleri yapılmıştır (Byun vd., 2011; Javaid vd., 2021; Ribeiro vd., 2013). Formülasyonlarda PVA konsantrasyonu sabit tutulurken karıştırma hızı (10000 rpm'den 20000 rpm'e) değiştirilerek ve orta karıştırma hızında sürfaktan (PVA) konsantrasyonunda (%0,3'ten %0,9 a/h'e) değişiklik yapılarak formüller hazırlanmış (Çizelge 2.3.) ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.3. Farklı karıştırma hızı (ÖN1-ÖN5) ve farklı PVA konsantrasyonu (ÖN3, ÖN6-7) ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları

Fazlar	Formülasyon içeriği	ÖN1	ÖN 2	ÖN 3	ÖN4	ÖN5	ÖN6	ÖN7
Yağ	PCL (mg)	100	100	100	100	100	100	100
	Ekstre (mg)	100	100	100	100	100	100	100
	DCM:Etanol (1:1) (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Su	PVA (mg)	75	75	75	75	75	150	225
	Su (ml)	25	25	25	25	25	25	25
Yağ fazı:su fazı (h/h)		1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
Polimer:ekstre (a/a)		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Karıştırma hızı (rpm)*		10000	12500	15000	17500	20000	15000	15000
PVA konsantrasyonu (% a/h)		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	0,9

*Karıştırma işlemi yüksek hızlı homogenizatör kullanılarak yapılmıştır.

Formülasyonlarda orta ve yüksek karıştırma hızı sabit tutularak ek karıştırma olarak prob sonikasyon (SonoPuls HD 2070, Bandelin, Almanya) (%38 güç, 9 cycles) uygulaması ile formüller hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. Ek karıştırma olarak prob sonikasyon uygulaması ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları

Fazlar	Formülasyon içeriği	ÖN8	ÖN9
Yağ	PCL (mg)	100	100
	Ekstre (mg)	100	100
	DCM:Etanol (1:1) (ml)	5	5
Su	PVA (mg)	225	225
	Su (ml)	25	25
Yağ fazı:su fazı (h/h)		1:5	1:5
Polimer:ekstre (a/a)		1:1	1:1
Karıştırma hızı (rpm)		15000 rpm + Prob sonikasyon	20000 rpm + Prob sonikasyon
PVA konsantrasyonu (% a/h)		0,9	0,9

Partikül boyutunu küçültebilmek için su fazı hacminde değişiklik yapılarak çalışmalara devam edilmiştir. ÖN8-9'da etkin bir farklılık tespit edilemeyerek, karıştırıcı değiştirilmiş ve homojenizatör (Ultra Turrax T25, IKA, Almanya) kullanımına devam edilmiştir. Formülasyonlarda organik faz hacmi sabit tutulurken su fazı hacmi azaltılarak (organik faz/ su fazı (h/h) 1:5'ten 1:2'ye) formüller hazırlanmış ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.5.).

Çizelge 2.5. Su fazı hacmi değiştirilerek hazırlanan nanopartikül formülasyonları

Fazlar	Formülasyon içeriği	ÖN10	ÖN11	ÖN12
Yağ	PCL (mg)	100	100	100
	Ekstre (mg)	100	100	100
	DCM:Etanol (1:1) (ml)	5	5	5
Su	PVA (mg)	180	135	90
	Su (ml)	20	15	10
Yağ fazı:su fazı (h/h)		1:4	1:3	1:2
Polimer:ekstre (a/a)		1:1	1:1	1:1
Karıştırma hızı (rpm)		20000	20000	20000
PVA konsantrasyonu (% a/h)		0,9	0,9	0,9

Formülasyonlarda uygun PDI (polidispersite indeksi) aralığına ulaşmak için organik faz bileşenleri olan DCM:Etanol oranı ve kriyoprotektan konsantrasyonu (mannitol) parametrelerinde değişiklikler yapılarak formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 2.6.).

Çizelge 2.6. Farklı DCM:Etanol oranı (ÖN13-15) ve kriyoprotektan konsantrasyonu (ÖN13, ÖN16-17) değişimi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları

Fazlar	Formülasyon içeriği	ÖN13	ÖN14	ÖN15	ÖN16	ÖN17
Yağ	PCL (mg)	100	100	100	100	100
	Ekstre (mg)	100	100	100	100	100
	DCM:Etanol	1:1	4:1	1:4	1:1	1:1
Su	PVA (mg)	225	225	225	225	225
	Su (ml)	25	25	25	25	25
Yağ fazı:su fazı (h/h)		1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
Polimer:ekstre (a/a)		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
PVA (% a/h)		0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Kriyoprotektan (%a/h)		-	-	-	2,5	5

Çizelge 2.6.'da yer alan formülasyonlardan kriyoprotektansız olanlara (ÖN14 ve ÖN15) formülasyonlarına kriyoprotektan ilave edilip ÖN18 ve ÖN19 formülasyonları hazırlanmıştır. Ayrıca organik faz hacmi 5 ml'den 10 ve 15 ml'ye çıkartılarak (Yağ fazı: su fazı hacmi değişimi 2:5 ve 3:5) ÖN20-21 formülasyonları, polimer:ekstre oranı değişimi ile ÖN22-23 formülasyonları hazırlanmıştır (Çizelge 2.7.).

Çizelge 2.7. Kriyoprotektan varlığında farklı DCM:Etanol oranı (ÖN17-19), yağ fazı: su fazı hacmi (ÖN17, 20-21) ve polimer:ekstre oranı (ÖN17,22-23) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonları

Fazlar	Formülasyon içeriği	ÖN17	ÖN18	ÖN19	ÖN20	ÖN21	ÖN22	ÖN23
Yağ	PCL (mg)	100	100	100	100	100	50	200
	Ekstre (mg)	100	100	100	100	100	100	100
	DCM:Etanol	1:1	4:1	1:4	1:1	1:1	1:1	1:1
Su	PVA (mg)	225	225	225	225	225	225	225
	Su (ml)	25	25	25	25	25	25	25
Yağ fazı:su fazı (h/h)		1:5	1:5	1:5	2:5	3:5	1:5	1:5
Polimer:ekstre (a/a)		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:2	2:1
PVA (% a/h)		0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Kriyoprotektan (%a/h)		5	5	5	5	5	5	5

Formülasyonlardan sadece ÖN19 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımında iyileşme elde edilebildiği için organik faz bileşeni DCM yerine aseton kullanılarak farklı polimer:ekstre oranı (ÖN24-25, 27) ve yağ fazı:su fazı hacmi oranı (ÖN25-26) kullanılarak ön denemelere devam edilmiştir (Çizelge 2.8.)(Coco vd., 2023).

Çizelge 2.8. Organik faz bileşeni DCM yerine aseton kullanılarak farklı polimer:ekstre oranı (ÖN24-25, 27) ve yağ fazı:su fazı hacmi oranı (ÖN25-26) kullanılarak nanopartikül formülasyonları

Fazlar	Formülasyon içeriği	ÖN24	ÖN25	ÖN26	ÖN27
Yağ	PCL (mg)	62,5	125	125	187,5
	Ekstre (mg)	125	125	125	125
	Aseton:Etanol	2:1	2:1	2:1	2:1
Su	PVA (mg)	450	450	225	450
	Su (ml)	50	50	25	50
Yağ fazı:su fazı (h/h)		1:4	1:4	1:2	1:4
Polimer:ekstre (a/a)		1:2	1:1	1:1	3:2
PVA (% a/h)		0,9	0,9	0,9	0,9
Kriyoprotektan (%a/h)		5	5	5	5

2.2.8.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

2.2.8.2.1. Ortalama Nanopartikül Büyüklüğü, Partikül Büyüklüğü Dağılımları ve Zeta Potansiyellerinin İncelenmesi

Dinamik ışık saçılımı prensibi ile ölçüm yapan Zetasizer cihazı (Zetasizer Nano ZS Malvern Instruments, İngiltere) ile partiküllerin çözünmediği ve şişmediği sulu dispersiyon

ortamında, süspande haldeki nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü (PB) ve polidispersite indeksi (PDI) tayin edilmiştir ($n=3$). Nanopartikül formülasyonlarının yüzey yüklerini tayin etmek amacı ile yine aynı cihazdan yararlanılmıştır (Ilhan vd., 2022; Oliveira vd., 2018). Hazırlanan nanopartiküller, ultra saf su içinde seyreltilmiş ve ölçümler, 25°C'de üç tekrar halinde yapılmıştır ($n=3$).

2.2.8.2.2. Nanopartiküllerde Etkin Madde Yükleme Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi

Nanopartikül hazırlanması aşamasında ultrasantrifüj sonrası ayrılan süpernatantın HPLC analiziyle etkin madde yükleme etkinliği (%EE) ve yükleme kapasitesi (%LC) tayini yapılmıştır (Blouza vd., 2006; Korzhikov vd., 2016; Nafee vd., 2013; Oliveira vd., 2018). Süpernatanttaki etkin madde konsantrasyonu belirlendikten sonra Eşitlik 2.3. ve 2.4.'te yerine yazılarak %EE ve %LC hesaplanmıştır.

$$\%EE = \frac{\text{Teorik etkin madde miktarı} - \text{Süpernatantdaki etkin madde miktarı}}{\text{Teorik etkin madde miktarı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 2.3.}$$

$$\%LC = \frac{\text{Teorik etkin madde miktarı} - \text{Süpernatantdaki etkin madde miktarı}}{\text{Nanopartikül ağırlığı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 2.4.}$$

2.2.8.2.3. Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin DSC ile İncelenmesi

Liyofilize *H.perforatum* ekstresi, PCL, ekstre ile polimerin fiziksel karışımı ve liyofilize *H.perforatum* ekstresi yüklü nanopartikülün DSC analizi yapılmıştır (Shimadzu (DSC 60), Japonya). Numuneler, alüminyum kaplarda doğru bir şekilde tartılmış ve kapatılmıştır. Tüm numuneler azot gazı altında 5°C/dk hızla 300°C'ye kadar ısıtılmış ve termogramlar kaydedilmiştir (Pourhojat vd., 2016).

2.2.8.2.4. Nanopartikül Formülasyonlarında Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin FTIR ile İncelenmesi

Liyofilize *H.perforatum* yüklü nanopartikül, boş PCL nanopartikül ve liyofilize *H.perforatum* ekstresi örneklerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) spektrumları, FTIR spektrofotometresi (Shimadzu FTIR-8040, Japonya) ile KBr disk yöntemi kullanılarak oda sıcaklığında tespit edilmiştir. Spektrumlar 400–4000 cm^{-1} aralığında, 4 cm^{-1}

çözünürlükte ve 32 taramayla kaydedilmiştir (Fraj vd., 2019; Mouro vd., 2021; Mutlu vd., 2022).

2.2.8.2.5. Nanopartiküllerde Işık Stabilitésinin Tayini

Bilinen miktarda *H.perforatum* ekstresi ile bu ekstreye eşdeğer miktarda ekstre içeren nanopartikül formülasyonu, ışığa karşı stabilite değerlendirmesi amacıyla bir hafta süreyle doğrudan güneş ışığına maruz bırakılmıştır. Numuneler, ışık geçiren ancak hava geçirmez özellikteki kapalı cam kaplar içerisinde tutulmuş ve bu süre boyunca ortam sıcaklığı kontrollü olarak izlenmiştir. Süre sonunda hem serbest ekstre hem de nanopartikül formülasyonu örneklerinden alınan analiz numuneleri, HPLC yöntemiyle (bkz. Bölüm 2.2.2.3.) analiz edilmiştir. Analizler kapsamında hiperisin ve psödohiperisin pikleri kromatografik olarak belirlenmiş ve her iki formülasyonda meydana gelen olası bozunma ya da stabilite farkları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Youssef vd., 2012).

2.2.8.2.6. Etkin Maddenin Nanopartiküllerden *In vitro* Salımı

In vitro etkin madde salım tayinleri, statik yöntemle gerçekleştirilmiştir (Ilhan vd., 2022). 4,80 µg hiperisine eşdeğer *H.perforatum* ekstresi içerecek miktarda liyofilize edilmiş nanopartikül tartılarak bir vial içine yerleştirilmiş ve üzerine 1 ml PBS eklenmiştir. Vialler, 37°C sıcaklıkta ve 75 rpm'de yatay çalkalayıcıya (MaxQ Mini 4450 Thermo Scientific, ABD) yerleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında, vialler 5000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve ardından süpernatant çekilerek 0,22 µm membran filtreler kullanılarak filtrelenmiştir. Çekilen süpernatant yerine eşit hacimde ve sıcaklıkta taze ortam çözeltisi eklenmiştir. Örneklerin analizleri, standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak 590 nm dalga boyunda HPLC yöntemiyle (bkz. Bölüm 2.2.2.3.) gerçekleştirilmiş ve zamana karşı kümülatif açığa çıkan etkin madde miktarı (%AÇEM) açısından değerlendirilmiştir.

2.2.8.3. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun DoE ile Belirlenmesi

H.perforatum yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında yer alan proses değişkenlerinin %EE, PB, PDI, ZP (zeta potansiyeli), %LC ve % üzerindeki etkileri Design-Expert® yazılımı (Sürüm 13.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir, elde edilen tasarım yanıtlarını optimize etmek için CCD kullanılmıştır.

ÖN24-27 nanopartikül verilerinden hareketle PCL miktarı (X_1) (62,5 mg, 187,5 mg ve 312,5 mg) ve PVA konsantrasyonu (X_2) (%0,6, %0,9 ve %1,2 ağırlık/hacim) bağımsız değişkenleri (faktörler) olarak seçilirken; %EE (Y_1), PB (Y_2), PDI (Y_3), ZP (Y_4), %LC (Y_5) ve %AÇEM (Y_6) bağımlı değişkenleri (yanıtlar) olarak belirlenmiştir. Her faktörün en yüksek ve en düşük seviyeleri, ön deneysel çalışmalar temel alınarak belirlenmiştir (Çizelge 2.9.).

Çizelge 2.9. Nanopartikül optimizasyonu için faktörler (bağımsız değişkenler) ve yanıtlar (bağımlı değişkenler)

FAKTÖRLER		SEVİYELER		
		-1	0	1
X_1	PCL Miktarı (mg)	62,5	187,5	312,5
X_2	PVA Konsantrasyonu (% a/h)	0,6	0,9	1,2
YANITLAR		OPTİMUM HEDEF		
Y_1	%EE	%80 ve üzeri		
Y_2	PB	Min 200 nm; max 1000 nm		
Y_3	PDI	0,4'ün altında		
Y_4	ZP	Min -10 mV		
Y_5	%LC	Maksimum		
Y_6	%AÇEM	Maksimum		

Design-Expert yazılımı kullanılarak 3 seviye 3 tekrar olmak üzere toplam yirmi yedi çalışma tasarlanmıştır. Partiküller, sistemi en yüksek genel istenirlik değerine sahip hale getirmek için Y_1 - Y_6 yanıtları için optimize edilmiştir. Tüm yanıtlar eşzamanlı olarak doğrusal, iki faktörlü etkileşime (2FI; two-factor interaction) ve ikinci dereceden yanıt yüzeyi modellerine uyarlanmış ve elde edilen polinom denklemleri, varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak doğrulanmıştır. Modelin anlamlılığını sağlamak için p değeri, düzeltilmiş çoklu korelasyon katsayısı (Adjusted- R^2), tahmin edilen çoklu korelasyon katsayısı (Predicted- R^2) ve çoklu korelasyon katsayısı (R^2) gibi istatistiksel parametreler belirlenmiş, sonuçları grafiksel olarak analiz etmek ve her yanıt için farklı faktörler arasındaki etkileşimin derecesini belirlemek için Design-Expert® yazılımı tarafından 3B RSM grafikleri oluşturulmuştur. Sayısal ve grafiksel analiz kullanılarak formülasyonu optimize etmek için istenirlik fonksiyonu tekniği kullanılmıştır. İstenirlik değeri 0 olduğunda kabul edilemez olarak kabul edilirken, 1'e yakın bir değer istenen cevaba karşılık gelir. CCD yöntemiyle oluşturulan ikinci dereceden polinom denklemi aşağıda sunulmuştur:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

Eşitlik 2.5.

burada Y yanıtı temsil eder, X_1 ve X_2 bağımsız faktörlerdir ve β_0 - β_{22} katsayılarıdır. Bu denklem, her faktörün çalışılan düzeylerine yönelik tepkiyi tahmin etmek ve regresyon katsayılarını karşılaştırarak her faktörün çalışılan diğer faktörlere göre etkisini belirlemek için kullanılır. Yapılan tasarım sonucunda optimal olduğu belirlenen bağımsız değişkenler kullanılarak optimal olacağı düşünülen partikül hazırlanmıştır (Çizelge 2.10.).

Çizelge 2.10. CCD tasarıma göre optimum nanopartikül formülasyonu

Fazlar	Formülasyon içeriği	Optimum nanopartikül
Yağ	PCL (mg)	62,5
	Ekstre (mg)	125
	Aseton:Etanol	2:1
Su	PVA (mg)	500
	Su (ml)	50
Yağ fazı:su fazı (h/h)		1:4
Polimer:ekstre (a/a)		1:2
PVA (% a/h)		1
Kriyoprotektan (%a/h)		5

2.2.9. Film Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Çalışma sürecinde incelenen literatürler verilerinden yararlanılarak, en uygun film formülasyonunun 3B baskı ile geliştirilmesi için kullanılacak etkin madde ve polimerlerin özellikleri incelenmiş, klasik çözücü dökme yöntemiyle, tamamıyla bir ön hazırlık olarak çeşitli ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Böylece 3B baskı çalışmalarına başlamadan önce klasik çözücü dökme yöntemiyle kitozan filmler hazırlanarak, hem borik asit ve plastizer ilavesinin film oluşumuna etkisi incelenmiş hem de filmlerde yapılacak karakterizasyon analizleri için yöntemlerin belirlenmesine çalışılmıştır.

2.2.9.1. Çözücü Dökme Yöntemiyle Hazırlanan Borik Asit Yüklü Film Formülasyonları

Düşük molekül ağırlıklı (LC) ve orta molekül ağırlıklı (MC) kitozan kullanılarak, %1 oranında (a/h) kitozan içeren çözeltiler hazırlanmıştır (Gunes ve Tihminlioglu, 2017). Bu çözeltiler, borik asit içeren ya da içermeyen, %1,5 (h/h) asetik asit içeren sulu çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. Hazırlanan karışımlar, oda sıcaklığında, kapalı kaplar içerisinde, 12 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılmıştır. Homojen hale gelen çözeltiler, enjektör filtresi yardımıyla filtre kağıdından geçirilerek süzölmüş ve ardından 15 dakika

süreyle ultrasonik banyoda bekletilerek hava kabarcıklarından arındırılmıştır. Elde edilen jel formundaki karışım, 5 cm çapındaki cam petri kaplarına dökülerek yüzey düzlüğü sağlanmış zeminlerde, oda sıcaklığında çözücünün buharlaşması için beklemeye bırakılmıştır. Kurumuş filmler kullanıma kadar uygun şartlarda, nem çekmeyecek şekilde saklanmıştır.

Öncelikle farklı molekül ağırlıklı kitozanların borik asitle birlikte hazırlanmasında borik asidin etkisini tespit etmek amacıyla formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 2.11.). İlk aşamada sadece LC ve MC ile deneme yapılmış ve plastizer olarak hem plastizer ve hem de borik asit çözücüsü olan gliserol ilavesi ile denemelere başlanmıştır (Hafezi vd., 2019; Hurler vd., 2012). Jeller ağırlıkça %3 a/h borik asit içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 2.11. Farklı molekül ağırlıklı polimer, plastizer ve borik asit ile çözücü dökme yöntemiyle ile hazırlanan önformülasyonlar

Formülasyon içeriği	ÖF1	ÖF2	ÖF3	ÖF4	ÖF5	ÖF6	ÖF7	ÖF8
LC (g)	0,20	0,20	0,20	0,20	-	-	-	-
MC (g)	-	-	-	-	0,20	0,20	0,20	0,20
Borik asit (g)	-	0,60	-	0,60	-	0,60	-	0,60
Gliserol (g)	-	-	0,24	0,24	-	-	0,24	0,24
Asetik asit (ml)	20	20	20	20	20	20	20	20

Kuruma sonrası borik asit içeren filmlerde kristallenme gözlemlendiği için, birim yüzey alanı (1 cm x 1 cm) olan kuru filmin ağırlığına göre %3 a/a borik asit içerecek şekilde hesaplanarak film içerisine yüklenmiş ve denemelere devam edilmiştir. Kuruma süresini kısaltmak için plastizer oranı da düşürülmüştür (Çizelge 2.12.).

Çizelge 2.12. Borik asit oranı değişen film formülasyonları

Formülasyon içeriği	ÖF9	ÖF10
LC (g)	0,20	-
MC (g)	-	0,20
Borik asit (g)	0,01	0,01
Gliserol (g)	0,10	0,10
Asetik asit (ml)	20	20

Değişen polimer oranının çözelti viskozitesine etkisini gözlemlemek için sabit borik asit ve plastizer oranına karşılık, %1 a/h kitozan içeren formüllerin yanı sıra, %3 ve %5 a/h oranlarında kitozan içeren film formülasyonları da hazırlanmıştır (Çizelge 2.13.).

Çizelge 2.13. Değişen kitozan oranlarında hazırlanan film formülasyonları

Formülasyon içeriği	ÖF9	ÖF11	ÖF12	ÖF10	ÖF13	ÖF14
LC (g)	0,20	0,60	1,00	-	-	-
MC (g)	-	-	-	0,20	0,60	1,00
Borik asit (g)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Gliserol (g)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Asetik asit (ml)	20	20	20	20	20	20
Kitozan konsantrasyonu (%)	1	3	5	1	3	5

3B baskı sırasında oldukça viskoz olabilecek bu filmlerin hacimce dökümü ve dolayısıyla %EE hesabı yapabilmeye karşılaşılabilecek zorluk sebebiyle filmlerin tüm içeriği ağırlıkça hazırlanmış ve ağırlıkça dökümü sağlanarak değerlendirilmiştir. Bunun için borik asit içeren (ÖF15), içermeyen (ÖF16), kitozan içerisine çözelti halinde borik asit ilave edilen (ÖF17) ve borik asit konsantrasyonu iki katına çıkartılarak (ÖF18) %2 a/a oranında MC içeren film formülasyonları hazırlanmıştır (Çizelge 2.14.).

Çizelge 2.14. Borik asidin formülasyona ilave şekli farklı olan film formülasyonları

Formülasyon içeriği	ÖF15	ÖF16	ÖF17*	ÖF18*
MC (g)	0,4	0,4	0,4	0,4
Borik asit (g)	0,01	-	0,01	0,02
Gliserol (g)	0,1	0,1	0,1	0,1
Asetik asit (g)	20	20	20	20
Kitozan konsantrasyonu (%)	2	2	2	2

* Borik asit formülasyona çözelti halinde ilave edilmiştir.

2.2.9.2. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Film Formülasyonlarının Hazırlanması

Klasik çözücü dökme yöntemiyle yapılan film formülasyonuna ait ön formülasyon çalışmalarıyla 3B baskı ile çalışılabilecek polimer viskozluğu, polimer konsantrasyonu, polimer-etkin madde etkileşimi ve plastizer etkisi hakkında önemli sonuçlar elde edilmiş ve 3B film çalışmalarına bu verilerden yola çıkılarak başlanmıştır.

Film formülasyonlarının hazırlanması için SSE 3B baskı yöntemi kullanılmıştır. Kitozan jeller, borik asit içeren ve içermeyen MC çözeltileri %1,5 (h/h) asetik asit içerisinde hazırlanmıştır (Gunes ve Tihminlioglu, 2017). Çözeltiler, gece boyunca karışmaya bırakılmıştır. Hazırlanan jeller 3B baskı cihazı kartuşlarına doldurulmuş ve baskı öncesi santrifüjlenerek (Sigma 3-30 KS, Almanya) (3000 rpm, 5 dk) hava kabarcıklarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ardından 3B SSE baskı cihazı (Axolotl, Axo A1, Türkiye) kartuşuna doldurulan jelden filamentin baskı hızı ile filament genişliği, değişen baskı basıncı, nozül hızı, baskı mesafesi ayarlamaları yapılmıştır. Bu parametreler filament füzyon ve collapse testleri ile görsel olarak kontrol edilmiş ve çeşitli baskı denemeleri yapılmıştır. Baskı için biyoprinting başlığı kullanılmıştır. İstenen şekil ve boyutta tasarlanan formata uygun şekilde .stl dosyaları oluşturulmuş ve farklı dolgu desenleri (bal peteği, ızgara, üçgen vb.) ve farklı desen yoğunluklarına göre bu şekiller dilimlenerek Gcode dosyaları oluşturulmuştur. Optimize edilen baskı basıncı ve baskı hızında 3B kitozan film baskıları alınmıştır. Tüm baskılar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Baskı alınan filmler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Değişen polimer oranının basılabilirliğe etkisini gözlemlemek için sabit borik asit ve plastizer oranına karşılık, %3, %4 ve %5 a/a oranlarında MC içeren jel formülasyonları hazırlanmıştır (Çizelge 2.15.).

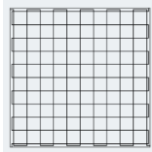
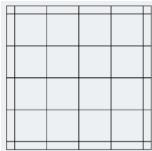
Çizelge 2.15. Sabit borik asit ve plastizer varlığında değişen oranlarında MC ile hazırlanan jel formülasyonları

Formülasyon içeriği	ÖF19	ÖF20	ÖF21
MC (g)	0,6	0,8	1,0
Borik asit (g)	0,01	0,01	0,01
Gliserol (g)	0,1	0,1	0,1
Asetik asit (g)	20	20	20
Kitozan konsantrasyonu (%)	3	4	5

Yukarıda verilen ön denemelerden sonra cihazda bulunan dolgu desenleri incelenmiş, desen doluluk oranlarındaki değişikliklerle baskısı alınacak olan filmin istenen porozitede hazırlanıp hazırlanamamasına etkisi değerlendirilmiştir. Cihaz yazılımında (AxoSuite, Türkiye) yer alan 13 dolgu deseninden ortagonal ve/veya diagonal forma yakın Çizelge 2.16.'da verilen doğrusal (rectilinear), hizalanmış doğrusal (aligned rectilinear) ve ızgara (grid) adı verilen dolgu desenleri seçilmiştir. Ardından cihaz kartuşuna doldurulan jelin baskı hızı ile basılan mürekkebin genişliği, değişen baskı basıncı, nozül hızı, baskı mesafesi

ayarlamaları yapılmıştır. Bu parametreler mürekkep füzyon ve collapse testleri ile görsel olarak kontrol edilmiş ve çeşitli baskı denemeleri yapılmıştır. Baskı için biyoprinting başlığı kullanılmıştır. Tüm baskılar konik tip baskı ucu ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. %4 (ÖF20) ve %5 (ÖF21) a/a MC'li jeller ile desen doluluk oranı (%infill density) ve katman yüksekliği (layer height) gibi cihazın yazılımına ait parametreler denenerek baskı çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 2.16. Farklı oranda kitozan ile hazırlanan jellerin farklı cihaz parametreleri (%doluluk oranı, katman yüksekliği, baskı basıncı) ile ön baskı çalışmaları.

Dolgu deseni (tek katman)*	Formülasyon	KOD	% Doluluk oranı	Katman yüksekliği (mm)	Nozül baskı hızı (mm/s)	Baskı basıncı (Psi)
 R	ÖF20	R1	20	0,1	7	1,8
		R2	30	0,1	7	1,8
		R3	40	0,1	7	1,8
		R4	30	0,15	7	1,8
		R5	30	0,1	5	1,8
		R6	30	0,15	9	1,8
		R7	30	0,1	8	3
	ÖF21	R8	30	0,1	7	10
		R9	30	0,1	9	10
		R10	30	0,2	9	10
		R11	30	0,15	9	10
		R12	20	0,15	9	10
		R13	40	0,15	9	10
		R14	30	0,2	9	10
 AR	ÖF20	AR1	30	0,1	7	2,5
		AR2	30	0,15	7	2,5
		AR3	70	0,1	8	1,8
		AR4	80	0,1	8	1,8
 G	ÖF20	G1	80	0,1	8	2,5
		G2	70	0,1	8	2,5
		G3	60	0,15	8	2,0
		G4	50	0,15	8	2,0
		G5	40	0,15	8	2,0
		G6	40	0,15	8	3,0
	ÖF21	G7	40	0,15	9	9,6
		G8	30	0,15	9	9,6

*R: Rectilinear; AR: Aligned Rectilinear; G:Grid

Basılabilir jel formülasyonları belirlendikten sonra önformülasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

%5 a/a MC içeren formüllerde farklı plastizer kullanımı (polietilen glikol (PEG 400), gliserol ve propilen glikol (PG)), plastizer oranı ve etkin madde miktarı parametrelerinde değişiklikler yapılarak (25 Gauge konik tip baskı ucu, 9 mm/s baskı hızı, rectilinear desen, %40 infill density, 10-50 psi baskı basıncı) yeni formülasyonlar hazırlanmış (F1-F10) (Çizelge 2.17.).

Çizelge 2.17. Farklı plastizer, plastizer oranı ve borik asit miktarı kullanılarak konik tip baskı ucu ile basılan film formülasyonları

Formülasyon içeriği	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
MC (% a/a)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
PG (% a/a)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG (% a/a)	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliserol (% a/a)	-	-	10	25	50	75	25	25	25	25
Borik asit (mg)	10	10	10	10	10	10	20	30	60	90
Asetik asit (g)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

F4 formülasyonundaki etkin madde oranları ve baskı ucu tipi değiştirilerek (25 Gauge **blunt tip** baskı ucu) denemeler yapılmıştır. Borik asit içermeyen (F11) ve 10 mg (F12), 30 mg (F13) ve 60 mg borik asit (F14) içeren formüllerin hepsinde %25'er gliserol ve 20 g asetik asit içeren filmler 9 mm/s baskı hızı, %40 infill density, 10-50 psi baskı basıncı ile hazırlanmıştır (Çizelge 2.18.).

Çizelge 2.18. Borik asit oranları değiştirilerek 25 Gauge blunt tip baskı ucu ile basılan film formülasyonları

Formülasyon içeriği	F11	F12	F13	F14
MC (% a/a)	5	5	5	5
Gliserol (% a/a)	25	25	25	25
Borik asit (mg)	-	10	30	60
Asetik asit (g)	20	20	20	20

Bu formülasyon gruplarından F12 formülasyonunu oluşturan jel kullanılarak Gcode düzenlemesi ile katmanlar arasına bekleme süresi ayarlanarak ek kurutma uygulanmış ve 10 kat (F15) ve 20 kat (F16) baskı alınmıştır (Çizelge 2.19.) (10 mg Borik asit, %5 kitozan, %25 gliserol, 9 mm/s baskı hızı, %40 infill density, 10-50 psi baskı basıncı).

Çizelge 2.19. Ek kurutma ve katman sayısı değiştirilerek hazırlanan film formülasyonları

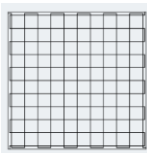
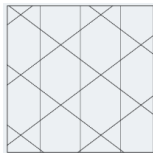
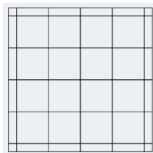
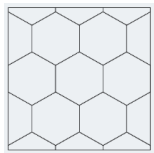
Formülasyon içeriği	F12	F15	F16
MC (% a/a)	5	5	5
Gliserol (% a/a)	25	25	25
Borik asit (mg)	10	10	10
Asetik asit (g)	20	20	20
Katman sayısı	10	10	20
Kurutma faktörü	Kurutma olmadan	Katmanlar arası kurutma	Katmanlar arası kurutma

%5 a/a MC içeren formüllerde borik asit oranı (%10 a/a) ve plastizer oranı (Gliserol-%25 a/a) sabit tutularak Axosuit yazılımına ait farklı desenler kullanılarak (25 Gauge blunt tip baskı ucu, 9 mm/s baskı hızı, %40 infill density, 10-50 psi baskı basıncı) yeni formülasyonlar hazırlanmıştır (F15-20) (Çizelge 2.20. ve Çizelge 2.21.).

Çizelge 2.20. Aynı içerikte farklı desenlerde 3B basılan film formülasyonları

	F15	F17	F18	F19	F20
MC (% a/a)	5	5	5	5	5
Gliserol (% a/a)	25	25	25	25	25
Borik asit (mg)	10	10	10	10	10
Asetik asit (g)	20	20	20	20	20
Desen	Rectilinear	Aligned Rectilinear	Triangles	Grid	Honeycomb

Çizelge 2.21. 3B baskı alınan desenler

Rectilinear	Aligned Rectilinear	Triangles	Grid	Honeycomb
				

2.2.9.3. 3B Basılmış Film Formülasyonlarının Karakterizasyonu

2.2.9.3.1. 3B Basılmış Filmlerde Kalınlık ve Viskozite Tayini

Her bir filmin ağırlığı ölçülmüş ve ardından 3B filmlerin kalınlığı, manuel bir mikrometre (NSK, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Jeller viskozimetre ile viskozite ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler T spindle-No:95 kullanılarak, 25 ± 1 °C'de, 100 rpm dönü

hızında RVTDV-2 viskozimetre (Brookfield, İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir ($n=3$) (Kilicarslan vd., 2018).

2.2.9.3.2. 3B Basılmış Filmlerde Etkin Madde Yükleme Etkinliği

Filmler, %1,5'lik asetik asit içinde 5 ml hacminde çözölmüş ve numunelerdeki borik asit miktarını belirlemek için doğrulanmış UV spektrofotometrik yöntem (bkz. Bölüm 2.2.3.1) kullanılarak analiz edilmiştir ($n=3$) (Kilicarslan vd., 2018).

2.2.9.3.3. 3B Basılmış Filmlerde Adezif Özelliklerinin İncelenmesi

3B baskı yöntemiyle hazırlanan film formölasyonlarının adezyon testlerinde, texture cihazı (TA-XT Plus, Stable Micro Systems, Birleşik Krallık) kullanılmıştır. Adezyon testi için, cihazın alt kısmında temas yüzeyi olarak %10 (a/h) müsün çözeltisiyle ıslatılmış filtre kağıdı kullanılmıştır. Filmler, çapı 12 mm olan silindirik bir probun (P/0,5R) alt kısmına çift taraflı yapışkan bant kullanılarak tutturulmuştur. Prob, film müsün kaplı filtre kağıdıyla temas edene kadar indirilmiştir. Adezyon testi; ön test, test ve son test olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilmiş ve probun hızı 0,5 mm/s olarak ayarlanmıştır. Prob, ürünle temas noktasından 10 mm'lik maksimum bir mesafeye kadar çekilmiş ve film ile müsün yüzeyi arasındaki temas süresi 60 saniye olarak belirlenmiştir. Filmin müsün yüzeyinden ayrılması için gereken kuvvet (F; N) maksimum kuvvet olarak belirlenmiştir ($n=3$) (Kilicarslan vd., 2018).

2.2.9.3.4. 3B Basılmış Filmlerde Gerilme Direnci, Elastikiyet ve Young's Modöl Tayini

3B baskı yöntemiyle hazırlanan film formölasyonlarının mekanik özelliklerinde, texture cihazı (TA-XT Plus, Stable Micro Systems, Birleşik Krallık) kullanılmıştır. Filmlerin gerilme direnci, elastikiyet ve young modöl değerlerini değerlendirmek için, Texture Analyser cihazının klipsleri arasına film yerleştirilmiştir (Aguirre vd., 2013). Başlangıç klips mesafesi 5 mm olarak ayarlanmış ve prob hızı 2 mm/s olarak belirlenmiştir. İstenen değerler, yazılım kullanılarak doğrudan (gerilim $\times$ uzama) eğrilerinden hesaplanmıştır. Young modöl ise eğrinin başlangıçtaki doğrusal kısmının eğimi olarak belirlenmiştir ($n=3$).

2.2.9.3.5. 3B Basılmış Filmlerde Şişme Derecelerinin Tayini

Hazırlanan film formülasyonlarının şişme özelliklerinin incelenebilmesi için film örnekleri tartılmış ve daha sonra 37°C’lik ortam sıcaklığında önceden ısıtılmış PBS içerisinde bekletilmiştir. % Şişme derecesi (Eşitlik 2.6.) belirlenen dakikalarda (*in vitro* salım tayininde numune alma süreleri ile eş zamanlı) PBS’ten çıkarılan filmlerin üzerindeki fazla su uzaklaştırıldıktan sonra tartılmış ($n=3$) ve hesaplanmıştır (Kilicarslan vd., 2018):

$$\% \text{ Şişme Derecesi} = \frac{\text{Filmin } t \text{ zamanındaki ağırlığı} - \text{Filmin ilk ağırlığı}}{\text{Filmin ilk ağırlığı}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 2.6.}$$

2.2.9.3.6. 3B Basılmış Filmlerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Morfolojik İncelemeleri

Taramalı elektron mikroskobu kullanılarak seçilen film formülasyonlarının yapısal özellikleri incelenmiştir. Farklı formülasyon parametreleri ile hazırlamanın filmlerin yapısal özellikleri, örnekler iletken altın ile kaplandıktan (Gatan, ABD) sonra mikroskop (Quanta 400F Field Emission, Thermo Fisher Scientific-FEI, Almanya) altında incelenmiştir (Kilicarslan vd., 2018).

2.2.9.3.7. 3B Basılmış Filmlerin 3B Mikroyapısının Görüntülenmesi

Formülasyonların mikro bilgisayarlı tomografi (mikro-BT) ile 3B mikro yapısı analiz edilmiştir (Kilicarslan vd., 2018). Bu amaçla, film formülasyonlarını taramak için yüksek çözünürlüklü masaüstü Mikro-BT (SkyScan 1275, Bruker, Belçika) sistemi kullanılmıştır (Tarama koşulları: 32 kVp, 120 mA, 0,5 mm Al/Cu filtre, 5,2, µm piksel boyutu, 0,2 adımda döndürme). Halka artefaktlarını en aza indirmek için, her taramadan önce dedektörün hava kalibrasyonu yapılmıştır. Her numune 5 dakikalık bir entegrasyon süresi içinde 360° döndürülmüştür. Ortalama tarama süresi yaklaşık 4 saattir. Diğer ayarlar, açıklandığı gibi ışın sertleştirme düzeltilmesini ve filmlerin önceden taranması ve yeniden yapılandırılmasına dayalı olarak üreticinin talimatlarına göre optimum kontrast sınırlarının girilmesini içermektedir.

Feldkamp vd. (1989) tarafından kullanılan analiz algoritmaları modifiye edilerek 1000 X1000 piksel çözünürlükte 2B görüntüler elde etme için CTAn (ver. 1.16.1.0, SkyScan, Belçika) ve NRecon yazılımları (ver. 1.6.10.4, SkyScan, Kontich, Belçika) kullanılmıştır. Elde

edilen bu görüntülerin yeniden yapılandırılması için sabit halka artefaktı düzeltmesi ve düzleştirme kullanılmıştır. Işın artefaktı düzeltmesi %40'a ayarlanmıştır. NRecon yazılımı kullanılarak, tarayıcı tarafından elde edilen görüntüler, filmlerin iki boyutlu kesitlerini göstermek için yeniden yapılandırılmıştır. Tüm hacimden elde edilen toplam 1023 kesit görüntüsü mikro-BT'de yeniden oluşturulmuştur. Ayrıca, filmlerin 3B hacimsel görselleştirilmesi ve analizi için CTAn (SkyScan, Aartselaar, Belçika) yazılımı kullanılmıştır. Tüm rekonstrüksiyonlar, 21,3 inç düz panel renkli aktif matris TFT medikal ekran (NEC MultiSync MD215MG, Münih, Almanya) üzerinde, 75 Hz'de 2048 - 2560 ve 11,9 bit hızında 0,17 mm nokta aralığında gerçekleştirilmiştir.

Yeniden yapılandırma aşamasından sonra, analiz edilen film görselleri üzerinde ilgili yazılım kullanılarak ilgi bölgesi (ROI) çizilmiştir ve her bir katmanın ayrımını tespit edebilmek için alt sınırı 0 ile 255 arasında, üst sınırı ise en yüksek yoğunluk değerine sahip spektrumunun üst ucunda kalacak şekilde eşik değeri ayarlanmıştır.

Bir numunenin gözenekliliğini tanımlamak için gözenek sayısı, gözenek hacmi, gözenek yüzeyi ve gözenek yüzdesi dahil olmak üzere birden fazla parametre kullanılabilir. Gözenek analizleri tipik olarak gözenekleri kapalı ve açık olarak alt bölümlere ayırır. Bu nedenle, doğru gözenek değerlendirmesi için açık ve kapalı gözeneklerin tanımının tam olarak anlaşılması gereklidir. Açık bir gözenek, ROI sınırıyla kesişen olarak tanımlanmaktadır. Başka bir deyişle, açık bir gözenek 2B veya 3B'de dışarıya bağlanırken, kapalı bir gözenek 2B veya 3B'de dışarıya bağlantısı olmayan bir gözenektir. Kapalı gözenekler, beyaz piksellerden oluşan bir kenarlıkla çevrelenmiş siyah pikseller olarak görülmektedir.

Bu çalışmada, her numunede numunenin tüm hacmi boyunca çeşitli parametreler ölçülmüştür; kapalı gözenek sayısı, kapalı gözenek hacmi, kapalı gözeneklilik (%), açık gözenek alanı hacmi (piksel² veya μm^2), açık gözeneklilik (%) ve toplam gözeneklilik, konnektivite ve konnektivite dansitesi, ayrıca, Toplam hacim (TV), Nesne hacmi (Obj.V), analiz edilen toplam film hacmine göre toplam miktarı ifade eden Nesne hacmi yüzdesi (Obj.V / TV (%)) ve gözenekli bir ortamın topolojisini açıklayan parametreyi ifade eden Konnektivite de ayrı ayrı değerlendirilmiştir.^a

^a Mikro-BT analizleri Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

2.2.9.3.8. 3B Basılmış Film Formülasyonlarında Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin DSC ile İncelenmesi

Borik asit, kitozan, borik asit ve kitozanın fiziksel karışımı ve liyofilize edilerek kurutulmuş borik asit içeren kitozan filmde DSC analizi yapılmıştır (Shimadzu (DSC 60), Japonya). Numuneler, alüminyum kaplarda doğru bir şekilde tartılmış ve kapatılmıştır. 5°C/dk hızla 300°C'ye kadar ısıtılmış ve termogramlar kaydedilmiştir (Zhang vd., 2006).

2.2.9.3.9. 3B Basılmış Film Formülasyonlarında Etkin Madde-Yardımcı Madde Etkileşiminin FTIR ile İncelenmesi

Borik asit, kitozan, fiziksel karışım ve borik asit içeren film örneklerinin FTIR spektrumları, FTIR spektrofotometresi (Shimadzu FTIR-8040, Japonya) ile KBr disk yöntemi kullanılarak oda sıcaklığında tespit edilmiştir. Spektrumlar 400–4000 cm^{-1} aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 32 taramayla kaydedilmiştir (Fraj vd., 2019; Mutlu vd., 2022; Özdemir ve Keskiner, 2018).

2.2.9.3.10. 3B Basılmış Filmlerde *In Vitro* Etkin Madde Salımı

Borik asit yüklü filmler, 37°C sıcaklıkta 5 ml pH 7,4 PBS içeren flakona yerleştirilmiş ve termostatik yatay çalkalayıcıda (MaxQ Mini 4450 Thermo Scientific, ABD) 75 rpm hızında çalkalanmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında, 0,2 ml çözünme ortamı alınarak yerine aynı sıcaklıktaki taze tampon çözeltisi eklenmiştir. Alınan örneklerdeki borik asit konsantrasyonu, UV spektrofotometrik yöntem (bkz. Bölüm 2.2.3.1) kullanılarak tayin edilmiştir. Zamana karşı % açığa çıkan kümülatif etkin madde miktarı (%AÇEM) grafikleri çizilerek salım profilleri açısından değerlendirilmiştir (Kilicarslan vd., 2018).

2.2.9.4. Optimum Film Formülasyonunun DoE ile Belirlenmesi

Design-Expert® yazılımı (Sürüm 13.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak çeşitli formülasyon değişkenlerinin 3B filmlerin özellikleri üzerindeki etkisini araştırmak ve optimum film formülasyonunu belirlemek için CCD kullanılmıştır. F18-20 formülasyon verilerinden hareketle 3B film formülasyon parametrelerinin seçilen kritik kalite özellikleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla deneysel tasarım için kritik malzeme özellikleri olarak iki faktör (Dolgu deseni (X_1 : Triangular, grid ve honeycomb) ve Borik asit

miktarı (X_2 : 10 mg, 20 mg ve 30 mg)) kullanılmıştır. Bağımsız değişkenlerin seviyeleri, maksimum tasarım alanı sağlayacak ve aynı zamanda 3B filmlerin uygun şekilde işlenmesini sağlayacak şekilde seçilmiştir (Çizelge 2.22.). Öte yandan, incelenen faktörlerin optimizasyonu için izlenecek sekiz yanıt seçilmiştir: Kalınlık (Y_1), %Yükleme etkinliği (Y_2), Adezyon kuvveti (Y_3), Mekanik direnç (Y_4), Elastikiyet (Y_5), Young's modül (Y_6), Şişme derecesi (Y_7) ve % Kümülatif AÇEM (Y_8). Filmler, en yüksek istenirlik değerine sahip formülü sağlamak amacıyla Y_1 - Y_8 yanıtları için değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.22. Film optimizasyonu için faktörler (bağımsız değişkenler) ve yanıtlar (bağımlı değişkenler)

FAKTÖRLER		SEVİYELER		
		-1	0	1
X_1	Desen	Triangular	Grid	Honeycomb
X_2	Borik asit miktarı	10 mg	20 mg	30 mg
YANITLAR		OPTİMUM HEDEF		
Y_1	Kalınlık	Minimum 300 μ m; Maksimum 600 μ m		
Y_2	%Yükleme Etkinliği	Maksimum		
Y_3	Adezyon kuvveti	Maksimum		
Y_4	Mekanik direnç	Minimum 2,5 MPa; Maksimum 35 MPa		
Y_5	Elastikiyet	Maksimum		
Y_6	Young's modül	Minimum		
Y_7	Şişme derecesi	Maksimum		
Y_8	%Kümülatif AÇEM	Minimum		

İstatistiksel tasarım yazılımı ile 27 deney tasarlanmıştır. Tüm yanıtlar eşzamanlı olarak Lineer, 2FI ve ikinci dereceden yanıt yüzeyi modellerine uyarlanmış ve elde edilen polinom denklemleri, varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak doğrulanmıştır. Modelin anlamlılığını sağlamak için p değeri, düzeltilmiş çoklu korelasyon katsayısı (Adjusted-R²), tahmin edilen çoklu korelasyon katsayısı (Predicted-R²) ve çoklu korelasyon katsayısı (R²) gibi istatistiksel parametreler belirlenmiştir. Sonuçları grafiksel olarak analiz etmek ve her yanıt için farklı faktörler arasındaki etkileşimin derecesini belirlemek için Design-Expert[®] yazılımı ile 3B yanıt yüzeyi grafikleri (RSM) oluşturulmuştur. Elde edilen denklemlerle optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.23.).

Çizelge 2.23. CCD tasarımı göre optimum film formülasyonu

	Optimum film formülasyonu
MC (% a/a)	5
Gliserol (% a/a)	25
Borik asit (mg)	30
Asetik asit (g)	20
Desen	Honeycomb

2.2.10. Nanopartikül Yüklü Yara Örtüsü Formülasyonlarının 3B Baskı Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Nanopartikül yüklü yara örtüsü formülasyonlarının hazırlanması için optimize edilen film ve optimum nanopartikül formülasyonu kullanılmıştır. Liyofilize edilen *H.perforatum* yüklü nanopartiküller kitozan filmin hazırlanacağı sulu ortamda disperse edildikten sonra asiditesi ayarlanmış ortama plastizer ve borik asit ilave edilerek homojen bir karışım elde edilmiştir. Ardından kitozan bu ortama ilave edilmiştir. Çözeltiler, homojen oluncaya kadar gece boyunca manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 500 rpm hızda karıştırılmıştır. Hazırlanan yara örtüsünü oluşturacak olan jel ile 3B baskı yöntemiyle baskı alınmış (25 Gauge blunt tip baskı ucu, 9 mm/s baskı hızı, %40 infill density, honeycomb desen, 10-50 psi baskı basıncı) ve kurumaya bırakılmıştır. Formülasyonda, sabit doz prensibi gözetilerek her filmde yaklaşık olarak 100 µg borik asit ve 2,5 µg hiperisine eşdeğer *H.perforatum* ekstresi olacak şekilde bir oran belirlenmiştir. Yara örtüsü formülasyonundaki hiperisin içeriğini belirlemek amacıyla, her bir yara örtüsü tartılarak cam flakonlara alınmış, üzerine 2,5 ml metanol ilave edilmiş, ışık geçirmeyen koşullarda, oda sıcaklığında ultrasonik banyoya yerleştirilerek 2 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Ardından homojenize edilerek elde edilen dispersiyon, santrifüj tüplerine alınarak 20000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan berrak kısımdan alınan 1 ml örnek, 0,45 µm PTFE membran filtreden süzülerek HPLC ile analiz edilmiştir. Yara örtüsü formülasyonundaki borik asit içeriğini belirlemek amacıyla film numunesi 5 ml %1,5 a/h asetik asit içerisinde manyetik karıştırıcı altında bir gece karıştırılmış, elde edilen karışım santrifüj tüplerine alınarak 20000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan berrak kısımdan 1 ml alınarak spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Film başına µg hiperisin ve borik asit cinsinden hesaplanmıştır. Ardından Bölüm 2.2.8.3.6.’da belirtildiği şekilde hiperisin ve Bölüm 2.2.9.4.10.’da belirtildiği şekilde borik asit için ayrı ayrı *in vitro* etkin madde salımının tayini gerçekleştirilmiş, her bir etkin maddenin tayini ayrı yöntemlerle yapıldığı için bir grup borik asit tayini üzerinden bir grup hiperisin tayini üzerinden test edilecek şekilde testler tekrarlanmıştır ($n=3$). Yara örtüsünde Bölüm 2.2.9.4.’te belirtilen 3B

basılmış filme ait karakterizasyon çalışmalarının tümü yapıp, bunlara ek olarak aşağıdaki analizler gerçekleştirilmiştir.

2.2.10.1. 3B Basılmış Yara Örtülerinde Su buharı Geçirgenliği Tayini

Yara örtüsü formülasyonlarının su buharı iletim hızları modifiye ASTM E96-95 standart yöntemine göre gravimetrik olarak analiz edilmiştir (Devi ve Dutta, 2017).. Belirli miktarda arıtılmış su içeren belirli ağırlık ve ebatlardaki şişelerin dairesel açıklığına uygun olarak filmler kesilerek monte edilmiştir ($n=3$). 37°C'de bir inkübatöre yerleştirilerek belirlenen sürede periyodik olarak yeniden tartılmış ve her bir film için zamanın fonksiyonu olarak filmin yüzey alanına düşen ağırlık farkları yüzde olarak hesaplanmıştır.

2.2.10.2. 3B Basılmış Yara Örtülerinde Oksijen Geçirgenliği Tayini

Yara örtüsü formülasyonlarının oksijen geçirgenlikleri, Winkler metoduna göre suda çözünmüş oksijen miktarının analiziyle yapılmıştır (Singh ve Pal, 2012). Belirli miktarda (1 ml) arıtılmış su içeren belirli ağırlık ve ebatlardaki şişelerin dairesel açıklığına uygun olarak filmler kesilerek monte edilmiştir ($n=3$). Pozitif kontrol olarak oksijenin şişeye girerek suda çözünmesine izin veren ağzı açık şişe kullanılmış, negatif kontrol olarak oksijenin şişeye girmesini önleyen kapaklı bir şişe kullanılmıştır. Tüm şişeler, oda koşullarında 24 saat boyunca bekletilmiş ve ardından her bir şişede bulunan su örneklerinden çözünmüş oksijen miktarı belirlenmiştir. Bu analiz için üç aşamalı Winkler titrasyon yöntemi uygulanmıştır. **Ön Reaksiyon;** numune içerisine 1,6 ml %48'lik mangan sülfat ve 3,2 ml alkalın iyodür çözeltileri ((%15'lik KI + %70'lik KOH) eklenerek, çözünmüş oksijen varlığında kahverengimsi mangan (IV) hidroksit çökeltilerinin oluşması sağlanmıştır. **Asitlendirme;** 4,8 ml %50'lik sülfürik asit ilavesi ile çökelti çözülerek iyot (I_2) açığa çıkarılmıştır. **Titrasyon;** ortamdaki serbest iyot, %0,31'lik standart sodyum tiyosülfat çözeltilisi (0,01 mg çözünmüş oksijenle eşdeğerdir) ile titre edilmiş ve %0,1'lik nişasta çözeltilisi ile renk değişimi takibi yapılmıştır. Harcanan sodyum tiyosülfat hacminden her şişedeki ml başına düşen çözünmüş oksijen miktarı (mg/l) hesaplanmıştır. Test grubu sonuçları, pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırılmıştır.

2.2.10.3. 3B Basılmış Yara Örtülerinde Stabilité Testleri

In vivo deneyler için seçilen uygun formülasyonlar iklim dolabında, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %60 $\pm$ %5 bağıl nem koşullarında, sterilizasyon koşulları bozulmayacak şekilde ağzı sıkı kapalı kapta ışık almayacak şekilde 6 ay boyunca tutulmuş ve 1, 3 ve 6. aylar olmak üzere en az 3 noktada örnek alınarak %EE, *in vitro* salım ve adezyon tayinleri yapılmıştır (ICH-Q1A(R2), 2003).

2.2.11. Hazırlanan Formülasyonların Antimikrobiyal Aktivite Analizleri

Boş nanopartikül yüklü boş film, *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film, yara örtüsü formülasyonu ve kontrol grubunun antibakteriyel aktiviteleri, *E.coli* ve *S.aureus* standart bakteri suşları ile değerlendirilmiştir (Ferrer vd., 2014). Bakterilerin bir gecelik taze kültürlerinden McFarland 0,5 bulanıklığına göre hazırlanan süspansiyonlar Tryptic Soy Broth'da 1/100 (10^6 CFU/ml) oranında seyreltilmiştir. Örnekler her bir bakteri grubu için ayrı ayrı muamele edilerek, 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her gruptaki canlı bakteri sayısı, örneklerin dilüsyonları yapılarak, Tryptic Soy Agar üzerine damlatma tekniği ile belirlenmiştir. Kontrole kıyasla test gruplarının log azalma ve yüzde azalma değerleri belirlenmiştir. Deneyler iki paralel ve üç kontrol olarak tekrarlanmış ve ortalama değerleri üzerinden hesaplamalar yapılmıştır.^b

2.2.12. Hazırlanan Formülasyonların Hücre Kültürü Deneyleri ile

Karşılaştırmalı Olarak *In Vitro* İncelenmesi

2.2.12.1. Sterilizasyon

Referanslar ışığında hücre kültürü ve *in vivo* çalışmalarımızda kullanılacak formülasyonlar (boş nanopartikül yüklü boş film, *H.perforatum* nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film ve yara örtüsü) sterilizasyonunda UV ile sterilizasyon yöntemi kullanılmıştır (Hafezi vd., 2019; Kumar vd., 2017; Liakos vd., 2014; Maver vd., 2018; Nunes

^b Antimikrobiyal aktivite analizlerine ait deneyler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

vd., 2011). Sterilizasyon için UV kabinli 3B yazıcıda (Axolotl, Axo A1, Türkiye) steril üretim yapılmıştır.

2.2.12.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü ve sitotoksikite deneyleri için fibroblast ve keratinosit hücreleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Deride bulunan bu hücreler bağ dokunun ana hücresel bileşenleri olmaları nedeniyle, kolajen ve ECM oluşumunda rol alırlar (Nzietchueng vd., 2002; Şen vd., 2019). Sitotoksikite analizlerinde **MTT assay** (Ahmed vd., 2018; Dadashzadeh vd., 2019; Intini vd., 2018; Jiang vd., 2016; Kaur vd., 2019; Pagano vd., 2019; Sandri vd., 2013), **MTS assay** ve **WST-I assay** (Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Wathoni vd., 2016) en sık kullanılan ISO/EN 10993-5 test yöntemleridir. Bu çalışmada formülasyonların sitotoksik etkisi ISO/EN 10993 ile belirlenmiş, Minimum Essential Medium (MEM) ekstraksiyon testi ile değerlendirilmiştir (ISO, 2009). Buna göre, steril örnekler hücre kültürü ortamı (%10 h/h fetal sıgır serumu ve %1 h/h penisilin-streptomisin içeren DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Eagles Medium) içinde sabit çalkalama altında 24 saat inkübe edilerek ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra L929 fare fibroblast hücreleri, 24 kuyulu hücre kültür kabına ekilmiş, 24 saat sonra ekstraksiyon sıvısı kuyucuklara eklenerek inkübe edilmiştir. Deney gruplarından elde edilen ekstraksiyon sıvıları hücre tabakaları üzerine eklenmiştir ($n=2$). Ekstraksiyon sıvılarının uygulanmasından 24, 48 ve 72 saat sonra, hücre tabakasının yayılımı (confluency) ve hücre morfolojisindeki değişimler mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Elde edilen mikroskopik bulgular, negatif kontrol grubuna göre düzeltilerek Çizelge 2.24.'te belirtilen değerlendirme kriterlerine göre puanlanmıştır. Değerlendirme sürecinde, hücre tabakasının yayılımı, ölü hücre miktarı ve hücre morfolojisindeki değişimler olmak üzere ilk üç kriterden elde edilen puanların ortalaması hesaplanmıştır. Bu ortalama değer, hücre büyümesi inhibisyonu kriterinden alınan puanla birleştirilerek, toplamda 0 ile 8 arasında değişen sitotoksik cevap indeksi elde edilmiştir (Çizelge 2.25.).

Çizelge 2.24. Sitotoksosite testi değerlendirme kriterleri

Hücreye ait parametre	Değerlendirme kriteri	Not
Yayılım (confluency)	%100	0
	%90-100	1
	%60-90	2
	%30-60	3
	%0-30	4
Ölü hücre sayısı (yüzen hücreler)	Hiç görülmedi	0
	%0-5	1
	%5-10	2
	%10-20	3
	≥ %20	4
Morfolojik değişim	Değişim gözlenmedi	0
	Az değişim var, az sayıda hücre etkilendi	1
	Orta seviyede değişim var, bazı hücrelerin morfolojisinde değişim gözlemlendi	2
	Orta seviyede değişim var, birçok hücrenin morfolojisinde değişim gözlemlendi	3
	Yüksek seviyede değişim var, tüm hücrelerin morfolojisinde değişim gözlemlendi	4
Büyümede inhibisyon	%0-10	0
	%10-30	1
	%30-50	2
	%50-70	3
	%70-100	4

Çizelge 2.25. Sitotoksik cevap indeksi ve sitotoksosite değerlendirmesi

Sitotoksik cevap indeksi	Reaktivite	“Malzeme Sitotoksiktir”
0-1	Yok	Hayır
1-3	Az	Hayır
3-5	Orta	Yeniden değerlendirilmeli
5-7	Fazla	Evet
7-8	Çok	Evet

2.2.12.3. *In Vitro* Yara İyileşmesi Deneyleri (Scratch Assay)

Hem *in vivo* deney sonuçlarının önceden tahmin edilebilmesi hem de yara iyileşme mekanizmasına dair ayrıntılı veriler elde edilebilmesi amacıyla *in vitro* yara iyileşmesi deneyleri yapılmaktadır (Demirci vd., 2016; Demirci vd., 2015; Dogan vd., 2014; Pagano vd., 2019). Kültüre alınan hücre hattının tek tabaka boyunca bir çizgi çizilerek bir hücre grubunun yer değiştirmesiyle yarayı temsil eden açık boşluğun kapanmasının mikroskopik olarak izlenmesi esasına dayanır. Tez çalışmamızda hayvan deneyleri ile elde edilecek verileri

kıyaslayabilmek ve biyoaktivite inceleyebilmek için seçilen formülasyonlar (boş nanopartikül yüklü boş film, *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film ve yara örtüsü) ile scratch assay deneyleri yapılmıştır. *In vitro* yara iyileşmesinin değerlendirilmesinde Human Dermal Fibroblast hücreleri 1×10^5 hücre/kuyucuk konsantrasyonda hücre içerecek şekilde 24 kuyulu hücre kültür kabında, hücre kültürü ortamı içinde (%10 h/h fetal sığır serumu ve %1 h/h penisilin-streptomisin içeren DMEM) 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra bu hücreler 200 µm'lik steril bir mikropipet ucu kullanılarak çizilmiş ve ortam sıvısı, hücre kültürü ortamı içinde 24 saat süreyle çalkalamalı şekilde inkübe edilerek ekstraksiyonu gerçekleştirilen taze ekstraksiyon sıvısı ile değiştirilmiştir. Farklı zaman aralıklarında (0, 12, 24 ve 36 saat) mikroskopik olarak hücre göçü izlenmiştir. Her durum için en az üç alan seçilmiş ve çizik alanlara göç eden hücrelerin sayısı hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak hücre kültürü ortamı kullanılmıştır (Demirci vd., 2016; Demirci vd., 2015; Dogan vd., 2014; Pagano vd., 2019).^c

2.2.13. Hazırlanan Formülasyonların Tedavideki Etki Gücünün *In Vivo* Değerlendirilmesi

Çalışmanın deneme aşaması etik kurul onayı (Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Karar No: 2022-2-17) alındıktan sonra 250-400 g erkek Wistar albino ırkı ratlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar altlık serilmiş metal kafeslerde, 22–24°C oda sıcaklığında, %55 nemde, 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık bir ortamda, su ve yemleri ad libitum verilerek bakım ve beslemeleri yapılmıştır.^d

Referanslardan elde edilen verilere ve yara çalışmaları verilerine dayanarak 0,05 anlamlılık düzeyi ve 0,95 güç ile çalışılacak 5 grup için tek yönlü varyans analizi testi kullanılarak (Statistica 12 İstatistik Paket Programı) (Anonymous, 2014) power analizi yapılmış ve denek sayısı her bir grup için 6 olarak belirlenmiştir. Verilerin istatistiksel olarak kabul edilebilmesi ve sonrasında insana yönelik yapılacak çalışmalarda yol gösterici olabilmesi için sayı bu şekilde hesaplanmıştır. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip deneklerimizden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar, aynı grupta olacak şekilde; her biri 6 rat içeren, biri (-) kontrol 4'ü deney grubu olmak üzere toplam 5 grup oluşturulmuş ve buna

^c Hücre kültürüne ait deneysel çalışmalar Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

^d *In vivo* hayvan deneyleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

göre çalışmada toplam 90 rat kullanılmıştır. Uygulamalarda kullanılan deney grupları ve hayvan sayıları Çizelge 2.26.'da gösterilmiştir. Geleneksel kullanımına ve literatür verilerine bağlı olarak bu bileşenleri (borik asit ve *H.perforatum*) bir arada içeren film şeklinde ya da jel olarak bir yara örtüsü piyasa preparatı bulunmadığı için bu aşamada pozitif kontrol grubu oluşturulmamıştır.

Çizelge 2.26. Deney hayvanları üzerinde yara sonrası yapılacak tek/kombine uygulamalar ve gruplandırması

Grup No	Grup adı	Grup başına hayvan adedi			
		7. Gün	14. Gün	21. Gün	Toplam
Grup 1	(-) Kontrol grubu	6	6	6	18
Grup 2	Boş film+Boş Nanopartikül	6	6	6	18
Grup 3	Boş film+ <i>H.perforatum</i> Nanopartikül	6	6	6	18
Grup 4	Borik asit yüklü film	6	6	6	18
Grup 5	Borik asit yüklü film+ <i>H.perforatum</i> Nanopartikül	6	6	6	18
Toplam		30	30	30	90

Yara iyileşme aktivitesinin tespit edilmesinde en sık kullanılan *in vivo* model olan ve yara kapanması ve epitelizasyon süresinin incelenmesine olanak sağlayan eksizyon yara modelidir. Aynı zamanda hem iyileşme süresi daha kısa süren akut yaralarda hem de etkilenen deri katmanı derinliğinin fazla olmasına bağlı olarak iyileşme süresi daha uzun olan kronik yaralarda temel olarak iyileşme prosesi benzerlik göstermektedir (Sibbald vd., 2013; Simoes vd., 2018). Bu nedenle hem akut yarayı hem de kronik yarayı temsil edeceği düşünülerek tam tabaka doku çıkarılmasıyla oluşturulan eksizyon yara modeliyle çalışılmıştır. Ratlarda deneysel yara oluşturmak için sırt kısmında 10 mm çaplı dairesel alanda çalışılmıştır. Anestezi uygulanan her bir ratın sırt kısmı tıraş edilmiş ve daha sonra %70'lik etanol ile dezenfekte edilmiştir. Ardından belirlenen kısımda 10 mm çaplı dairesel tam tabaka deri parçası punch biyopsi ile cerrahi olarak çıkarılarak eksizyon yarası oluşturulmuştur (Şekil 2.3.). *In vitro* değerlendirmeler sonucunda en uygun bulunan, etkin madde içeren ve içermeyen formülasyon grupları ayrı ayrı farklı gruplardaki deney hayvanlarında bu bölgeye uygulanmış, hayvanların hareket ederek formülasyonları çıkarma ihtimaline karşı dikiş ile bölgeye tek noktadan tutturulmuş ve gün aşırı aralıklarla yara kapanmaları değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra (-) kontrol grubunda yara oluşturma sonrası hiçbir ilaç uygulaması yapılmadan ve yine belirlenen zaman aralıklarında kontroller yapılmıştır. Her bir grup için 7.gün, 14.gün ve 21. günün sonunda deneklerin yüksek dozda anestezi ile ötenazisi sağlanmıştır (Dogan vd., 2014; Nunes vd., 2011; Sutar vd., 2011).



Şekil 2.3. Deney hayvanlarında cerrahi yaranın oluşturulması (A) ve formülasyonun yaraya uygulanması (B,C)

2.2.13.1. *In vivo* Çalışmadan Elde Edilen Deri Örneklerinde Mikro-BT

İncelemeleri

Ratlardan deri örnekleri alındıktan sonra yara iyileşmesi *in vitro* Mikro-BT taramaları ile yapılmıştır. Örnekleri taramak için yüksek çözünürlüklü, masaüstü Mikro-BT sistemi kullanılmıştır. Tarama koşulları: 30 kVp, 100-250 mA, 10 µm piksel boyutudur. Halka artefaktlarını en aza indirmek için, her taramadan önce dedektörün hava kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir. Her örnek 10 dakikalık bir entegrasyon süresi içerisinde 360° döndürülmüştür ve ortalama tarama süresi yaklaşık 1 saattir. Diğer ayarlar, önceki tarama ve numunenin rekonstrüksiyon değerleri esas alınarak üreticinin talimatlarına göre ışın sertleştirme düzeltilmesini içermektedir. Örneklerin rekonstrüksiyonu için Feldkamp vd. (1989) 'nın modifiye edilmiş algoritmasını kullanan CTAn (ver. 1.16.1.0, SkyScan) ve NRecon yazılımı (ver. 1.6.10.4, SkyScan, Kontich, Belçika) kullanılmıştır. NRecon yazılımı (Skyscan, Kontich, Belçika) kullanılarak, tarayıcı tarafından elde edilen görüntüler numunenin 2B görüntüleri yeniden oluşturulmuştur. Kesitsel görüntüler Mikro-BT'de tüm hacimden yeniden oluşturulmuştur. Ayrıca, CTAn (Skyscan, Aartselaar, Belgium) yazılımı, 3B volumetrik görselleştirme, analiz ve Mikro-BT için ölçümün alan/hacmi için kullanılmıştır.

Hücrel ve hücrel olmayan doku bileşenlerinin Mikro-BT ile ölçümünde farklı hücrel bileşimlerini gösteren parametreler farklı yapısal organizasyonunu yansıtır. Mikro-BT'de aşağıdaki parametreler bu farkı ortaya çıkarmak ve deri örneklerini analiz etmek için kullanılmıştır. AV/TV analiz edilmiştir ve bu değer analiz edilen doku hacmi (AV) ile ilişkili olarak mevcut olan toplam doku miktarını (TV) ifade eder. Kabaca belirli bir doku bölgesinin karmaşıklığının bir belirleyicisi olarak yorumlanabilen kesişim yüzeyi, düzenli tekrarlayan yapılar gösteren normal alanlardan önemli ölçüde farklı bulunacaktır. Konnektivite (bağlantı), gözenekli bir dokunun topolojisini tanımlayan parametreyi ifade eder. Mikro-BT

ölçümlerinin, *ex vivo* çalışmalarda bağlantı yoğunluğunun yapıdaki sayı ile yüksek oranda ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca, örneklerdeki damarlanma için aşağıdaki yöntem uygulanmıştır. Kemik anatomisinin aksine, kan damarları Mikro-BT görüntüleme için çok az doğal kontrast sağlar. Bu nedenle vaskülarizasyonun Mikro-BT ile takibinde özel kontrast ajanlara ihtiyaç duyulur. Bu tür kontrast maddelerin yüksek radyo opasitesi, manipülasyon ve enjeksiyon kolaylığı ve incelenmek istenen vasküler yatağı doldurmasını sağlayacak fiziksel özellikler içermesi beklenir. Bu çalışmada mikro damar sistemlerini incelemek için silikon kauçuk ve inert özelliklerinden dolayı literatürde de bu tür çalışmalarda sıklıkla tercih edilen Microfil (Microfil, Flow Tech, Carver, MA) kullanılmıştır. Buna göre Mikro-BT üretici firmanın talimatlarına uygun olarak Microfil'e özgü ışın sertleştirme düzeltmesi uygulanmış ve optimum kontrast sınırları tanımlanmıştır.

Ayrıca, damar sayısı, kalınlık (lümen çapı), kalınlık dağılımı ve ayırma, 3B hacimlerde kalınlığı değerlendirmek için modelden bağımsız bir yöntem kullanılarak hesaplanabilir. Bu teknik, ilgilenilen hacimdeki (VOI) her vokselde bir yerel kalınlığını hem voksel içeren hem de tamamen ilgilenilen yapı içinde olan en büyük kürenin çapı olarak tanımlar. Yerel voksel kalınlıklarının ortalaması damar kalınlığı parametresini verir ve arka plan voksellerinde benzer bir hesaplama damar ayrılmasını belirler. Damar numarasını hesaplamak için, bölümlenmiş hacim iskeletleştirilir ve yapıdaki damarların orta eksenlerinde sadece vokseller kalır. Damar numarası, bölümlenmiş hacimdeki yapıların orta eksenleri arasındaki ortalama boşluğun tersi olarak tanımlanır. Bu parametreler sırası ile hesaplanmıştır. Anizotropi, segmentlere ayrılmış 3B vasküler yatağın yönünün hangi dereceye kadar yönlendirildiğini tanımlar. 1,0'lik bir anizotropi derecesi, vasküler ağın mükemmel bir şekilde izotropik olduğunu gösterir ve daha yüksek anizotropi derecesi değerleri, bir yapının tercihli bir malzeme yönü içerdiğini gösterir. Anizotropi, vasküler ağlarda istenmeyen boşlukları temsil eden vasküler yapıların 3B görüntülerinde süreksizlikleri birleştirmek için kullanılır. Tez çalışmasında bu parametre de hesaplanmıştır. Son olarak histopatoloji için hazırlanan kasetler yeniden taranmış ve histopatoloji ile karşılaştırma yapabilmek için doku kalınlığı, doku bağlantı parametreleri histopatolojik kasetlerden de hesaplanmıştır (Bilezikian, 2015; Orhan, 2020).^e

^e Mikro-BT analizleri Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

2.2.13.2. *In vivo* Çalışmadan Elde Edilen Deri Örneklerinde Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik inceleme amacıyla ötenazi yapılan hayvanlardan uygulama yapılan alandaki dermis ve epidermis tabakasını içerecek şekilde taze doku örnekleri alınarak %10 tamponlu formalin ile 48 saat tespit edilmiştir. Tespit işleminin ardından dokular parafinde bloklanmış ve her bir bloktan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Rutin doku takibi sonrasında kesitler, hematoksilen-eozin (HxE) ve Masson's Trikrom ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenerek uygun görülen sahalardan görüntüler alınmıştır (Demirci vd., 2016; Yucel vd., 2017). Bu görüntülerden epidermisteki fibroblast proliferasyonu, mononükleer ve/veya polimorfonükleer hücreler, neovaskülarizasyon durumları ile dermisteki kolajen birikimleri, epidermal veya dermal epitelizasyon seviyesi tespit edilmiştir. Masson's Trikrom ile boyanmış kesitler kolajen birikimi analizinde kullanılmıştır. Hem *in vitro* Mikro-BT taramaları ile hem histopatolojik analiz sonunda elde edilen sonuçlar birleştirilmiş, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilerek tüm gruplarda enflamasyon, proliferasyon ve yeniden modelleme olarak yara iyileşme evreleri belirlenmiştir.^f

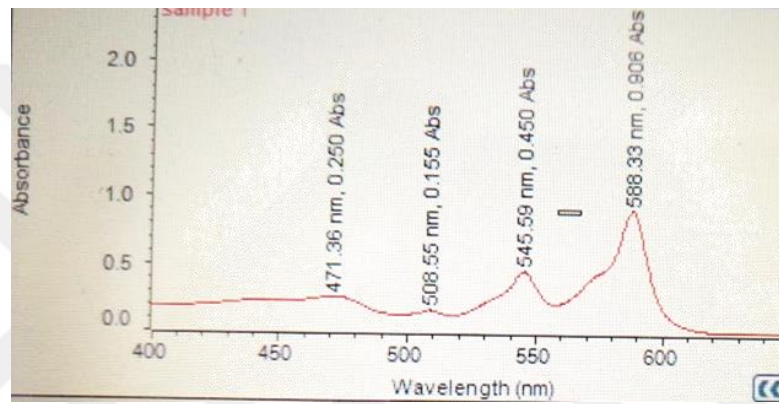
^f Histopatoloji analizleri Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

3. BULGULAR

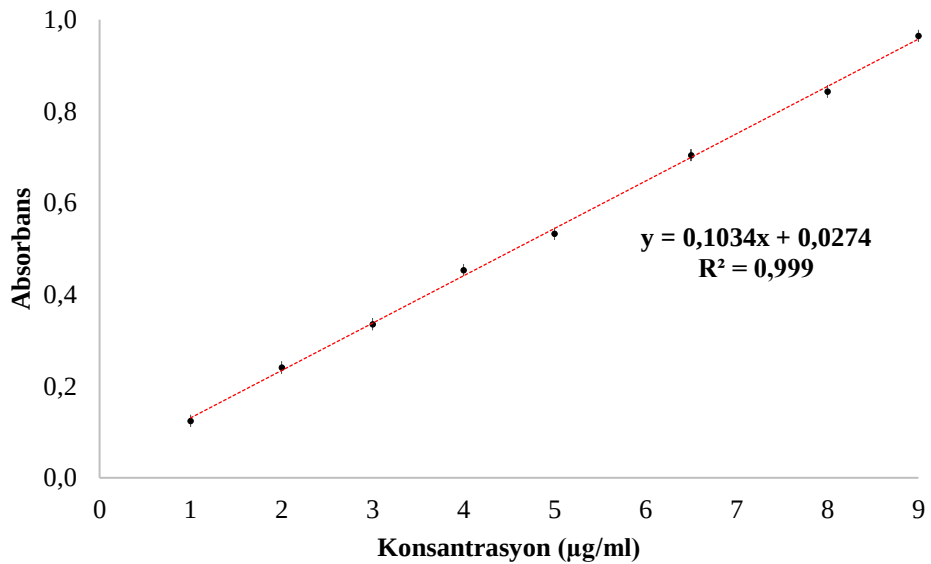
3.1. *H.perforatum*'un Standardı ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1. *H.perforatum*'un Standardının UV-Vis Spektrumu

Etkin maddenin UV-Vis spektrofotometre ile alınan spektrumu ile kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de verilmiştir.



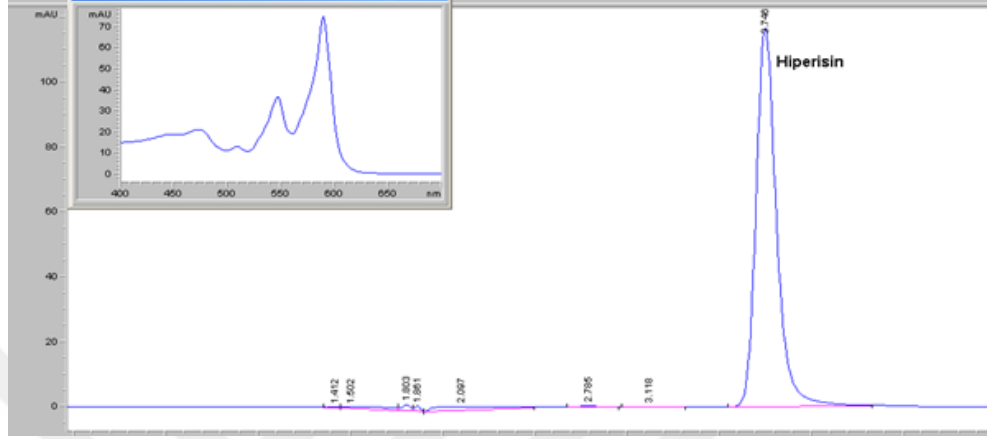
Şekil 3.1. Total hiperisin'in metanol ortamındaki UV-Vis spektrumu



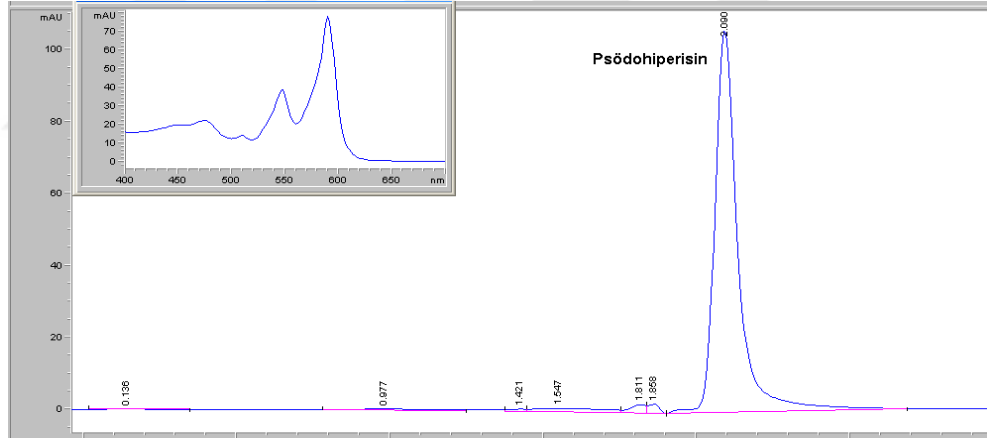
Şekil 3.2. Total hiperisin'in metanol ortamında UV spektrofotometre yöntemiyle belirlenen kalibrasyon grafiği ve denklemi

3.1.2. *H.perforatum*'un Standardının HPLC Kromatogramı

Hiperisin ve psödohiperisin standartlarının HPLC ile alınan kromatogramı ve spektrumu Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.'te yer almaktadır.

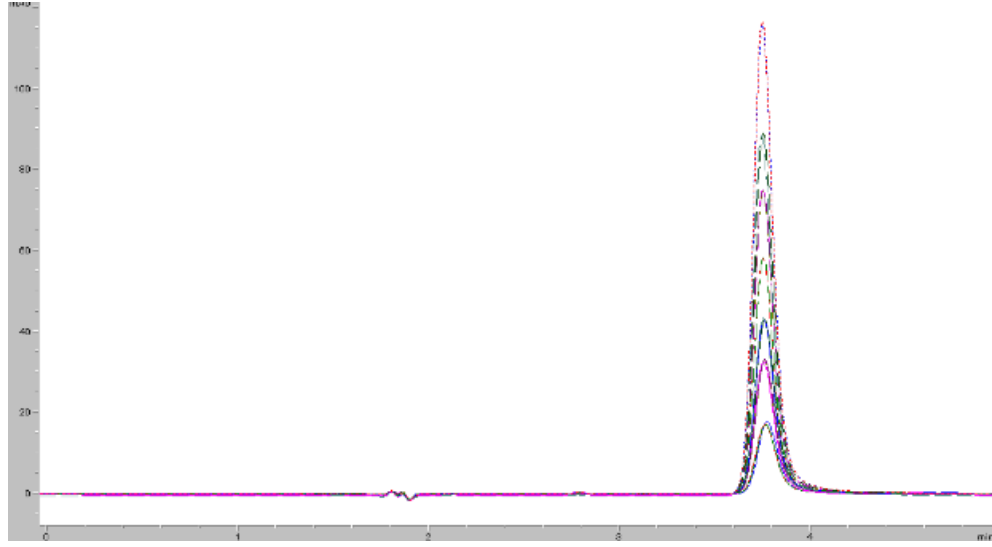


Şekil 3.3. Hiperisin standardının metanol ortamında HPLC kromatogramı ve spektrumu

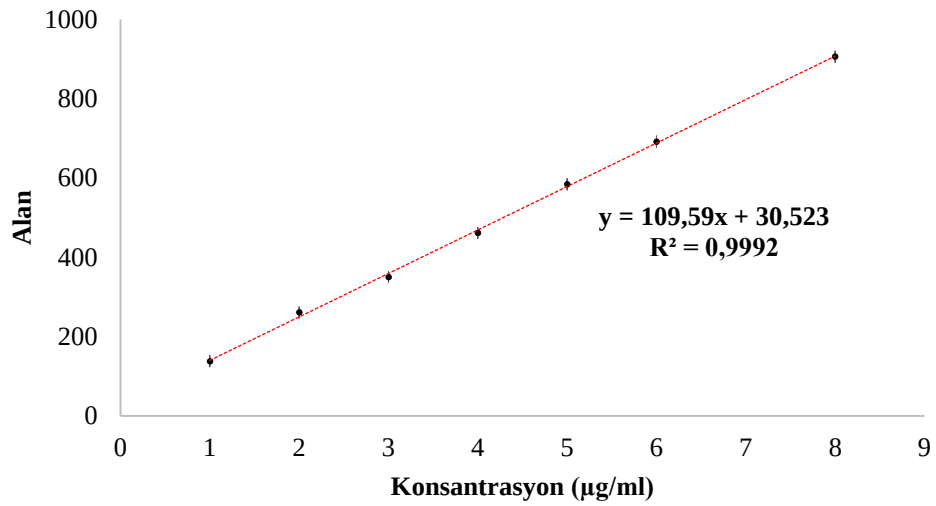


Şekil 3.4. Psödohiperisin standardının metanol ortamında HPLC kromatogramı ve spektrumu

HPLC yöntemiyle metanol ortamındaki hiperisin standardının artan konsantrasyonlarına ait kromatogramları Şekil 3.5.'te, belirlenen kalibrasyon grafiği ve denklemi ise Şekil 3.6.'da gösterilmektedir.

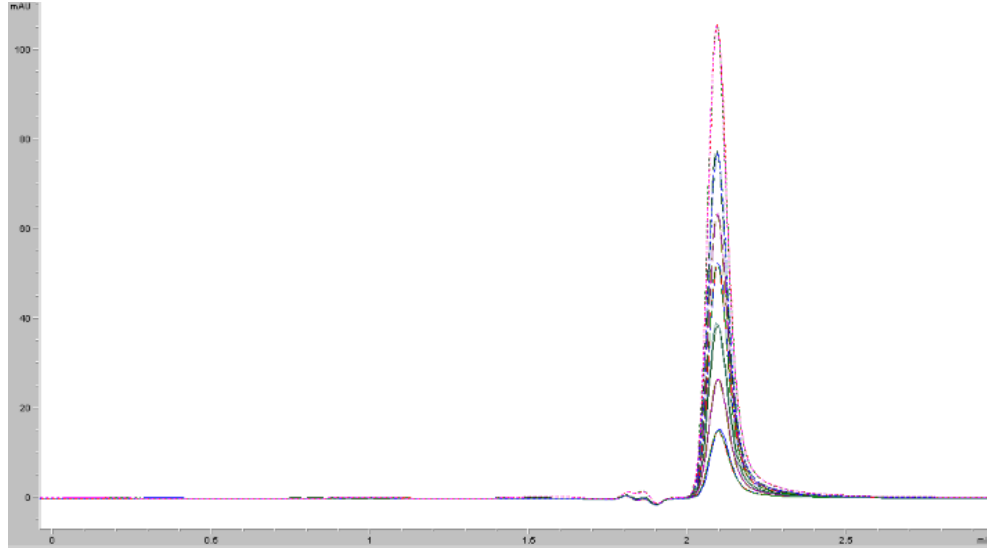


Şekil 3.5. Metanol ortamındaki hiperisin standardının artan konsantrasyonlarına ait HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogramları

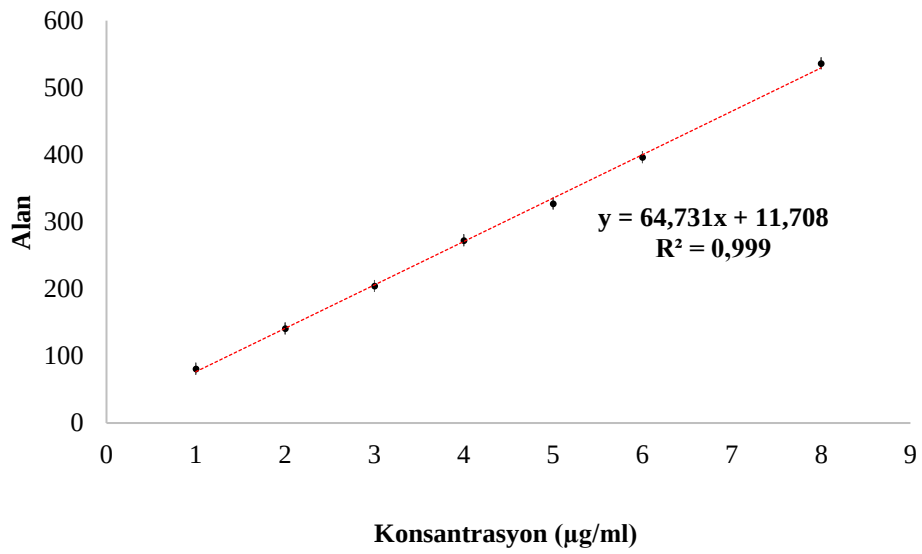


Şekil 3.6. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi

HPLC yöntemiyle metanol ortamındaki psödohiperisin standardının artan konsantrasyonlarına ait kromatogramları Şekil 3.7.'de, belirlenen kalibrasyon grafiği ve denklemi ise Şekil 3.8.'de gösterilmektedir.

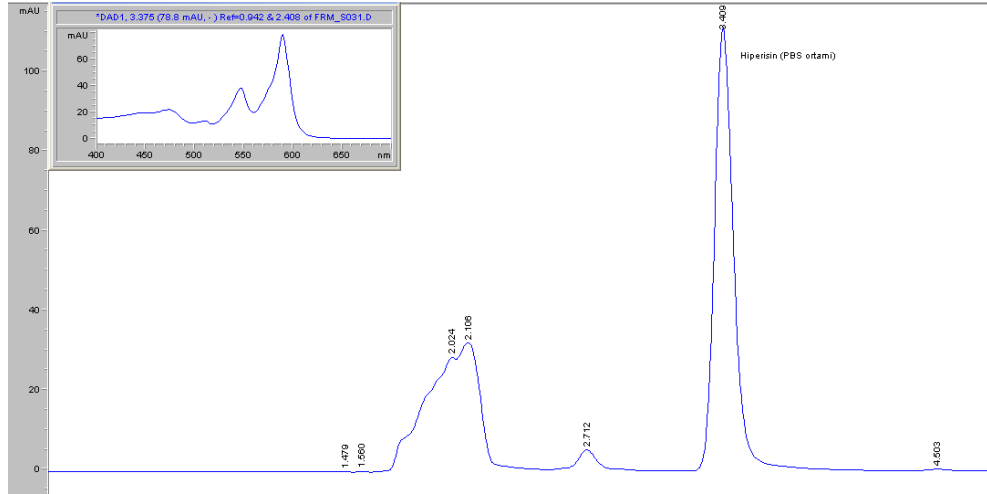


Şekil 3.7. Metanol ortamındaki psödohiperisin standardının artan konsantrasyonlarına ait HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogramları



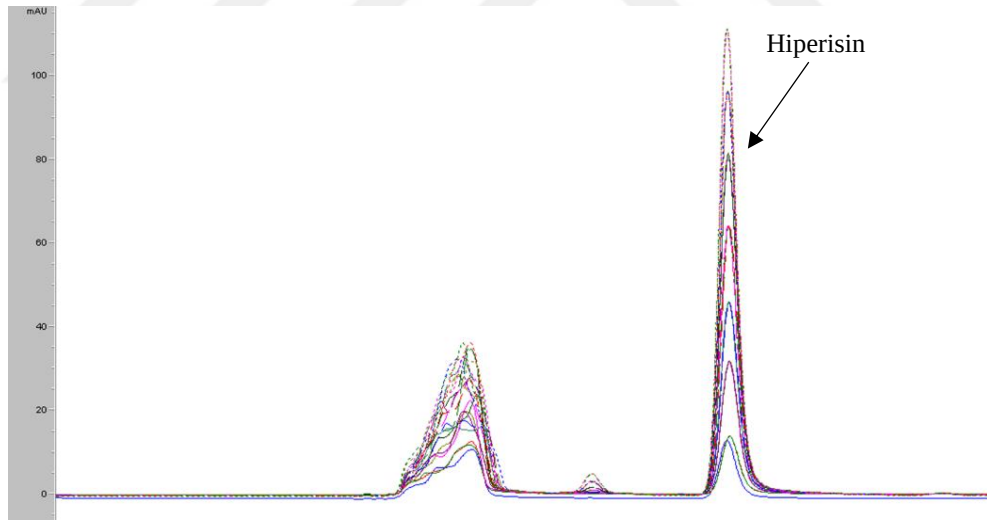
Şekil 3.8. Psödohiperisin standardının HPLC ile metanol ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi

Hiperisin standardının PBS ortamında HPLC ile alınan kromatogramı ve spektrumu Şekil 3.9.'da yer almaktadır.

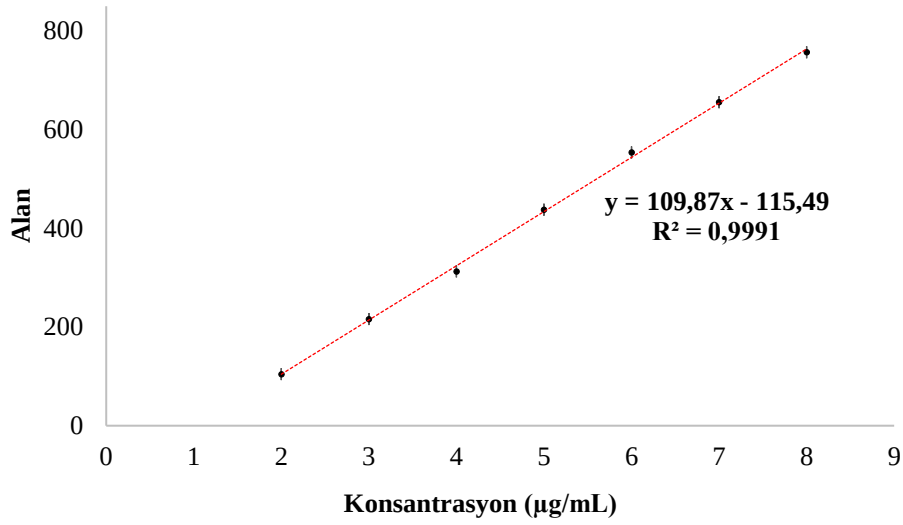


Şekil 3.9. Hiperisin standardının PBS içerisindeki HPLC kromatogramı ve spektrumu

HPLC yöntemiyle PBS ortamındaki hiperisin standardının artan konsantrasyonlarına ait kromatogramları Şekil 3.10.'da, belirlenen kalibrasyon grafiği ve denklemi ise Şekil 3.11.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.10. PBS ortamında hiperisin standardının artan konsantrasyonlarda HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogramları

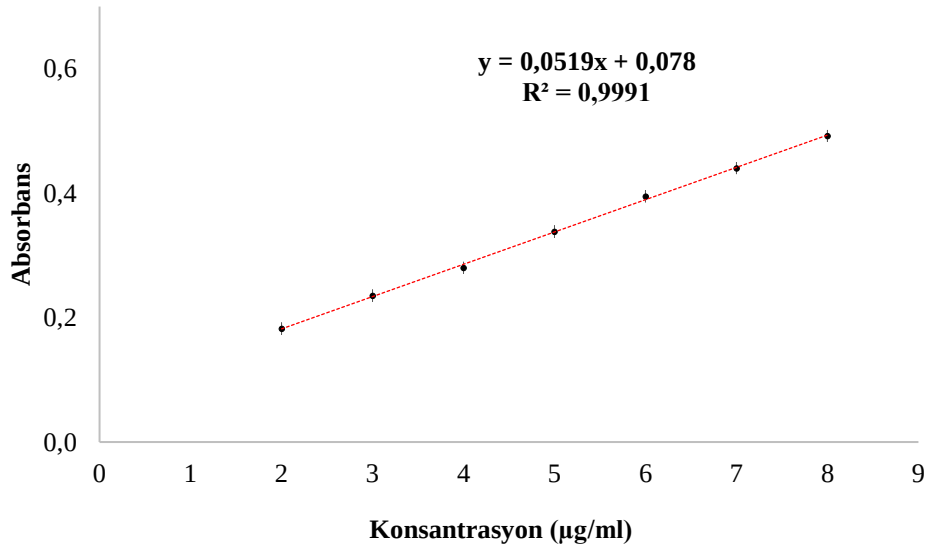


Şekil 3.11. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle PBS ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi

3.2. Borik Asit ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

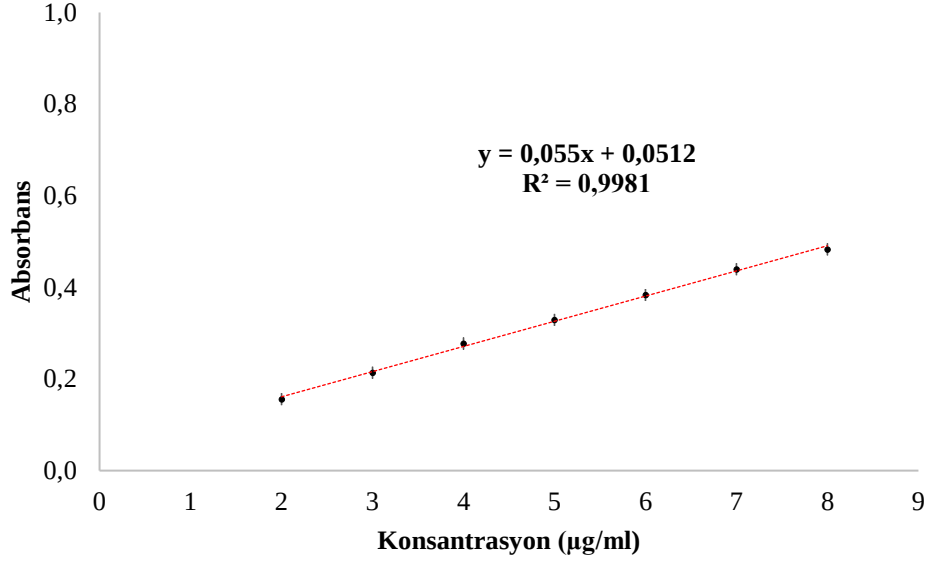
3.2.1. Borik Asitin UV-Vis Spektrumu

Borik asitin UV-Vis spektrofotometre ile %1,5 (h/h) sulu asetik asit ortamında elde edilen kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 3.12.'de yer almaktadır.



Şekil 3.12. Borik asitin %1,5 (h/h) sulu asetik asit ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi

Borik asitin UV-Vis spektrofotometre ile PBS ortamında elde edilen kalibrasyon grafiği ve denklemi Şekil 3.13.'te yer almaktadır.



Şekil 3.13. Borik asitin PBS ortamındaki kalibrasyon grafiği ve denklemi

3.3. Etkin maddelerin HPLC Yöntemi ve UV-Vis Spektrofotometre Yöntemi ile Miktar Tayininin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular

3.3.1. Doğruluk

Etkin maddelerin çeşitli ortamlardaki miktar tayininin doğruluğuna ve geri eldesine ilişkin elde edilen bulgular ve ilgili parametreler Çizelge 3.1.-3.6.'da verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hiperisin standardının metanol ortamında HPLC yöntemiyle hiperisin miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar

Ortam	2 µg/ml		5 µg/ml		7 µg/ml	
	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
HİPERİSİN METANOL ORTAMI	2,10	105,11	4,72	94,33	6,35	90,66
	2,08	104,11	4,70	94,04	6,36	90,81
	2,09	104,38	4,72	94,37	6,39	91,30
	2,09	104,65	4,72	94,35	6,35	90,74
	2,10	104,79	4,74	94,90	6,38	91,20
	2,09	104,75	4,72	94,42	6,36	90,91
	Ortalama	104,63	Ortalama	94,40	Ortalama	90,94
	SS	0,35	SS	0,28	SS	0,26
	%BSS	0,33	%BSS	0,29	%BSS	0,28

Çizelge 3.2. Psödohiperisin standardının metanol ortamında HPLC yöntemiyle psödohiperisin miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar

Ortam	2 µg/ml		4 µg/ml		7 µg/ml	
	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
PSÖDOHİPERİSİN METANOL ORTAMI	2,08	104,12	4,03	100,64	6,87	98,18
	2,10	105,20	4,04	100,95	6,93	99,07
	2,07	103,34	4,09	102,15	6,97	99,60
	2,06	102,88	4,01	100,22	6,97	99,60
	2,05	102,57	4,07	101,72	7,04	100,52
	2,07	103,50	4,07	101,84	7,01	100,13
	Ortalama	103,60	Ortalama	101,26	Ortalama	99,52
	SS	0,95	SS	0,76	SS	0,82
	%BSS	0,91	%BSS	0,75	%BSS	0,83

Çizelge 3.3. Hiperisin standardının *in vitro* çözünme ortamında HPLC yöntemiyle miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar

Ortam	3 µg/ml		5 µg/ml		8 µg/ml	
	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
HIPERİSİN PBS ORTAMI	2,81	93,80	4,84	96,80	7,62	95,25
	2,81	93,71	4,85	96,99	7,63	95,42
	2,81	93,59	4,85	97,06	7,64	95,46
	2,81	93,62	4,85	97,00	7,63	95,36
	2,81	93,62	4,85	96,99	7,63	95,34
	2,80	93,38	4,84	96,82	7,63	95,36
	Ortalama	93,62	Ortalama	96,94	Ortalama	95,37
	SS	0,14	SS	0,10	SS	0,07
	%BSS	0,15	%BSS	0,11	%BSS	0,08

Çizelge 3.4. Total hiperisinin metanol ortamındaki UV spektrofotometre yöntemiyle miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar

Ortam	2 µg/ml		5 µg/ml		8 µg/ml	
	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
HIPERİSİN METANOL ORTAMI	2,04	101,86	5,45	109,04	8,02	100,20
	2,05	102,35	5,54	110,79	8,17	102,13
	2,09	104,28	5,55	110,98	8,14	101,77
	2,10	104,76	5,55	110,98	8,31	103,83
	2,10	105,25	5,53	110,59	8,30	103,70
	2,14	107,18	5,52	110,40	8,28	103,46
	Ortalama	104,28	Ortalama	110,46	Ortalama	102,52
	SS	1,96	SS	0,73	SS	1,42
	%BSS	1,88	%BSS	0,66	%BSS	1,39

Çizelge 3.5. Borik asitin UV spektrofotometrik yöntemle %1,5 (h/h) sulu asetik asit ortamındaki miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar

Ortam	3 µg/ml		5 µg/ml		7 µg/ml	
%1,5 (h/h) ASETİK ASİT ORTAMI	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
	2,85	95,02	4,89	97,84	7,11	101,52
	2,83	94,38	4,91	98,22	7,14	102,07
	2,85	95,02	4,93	98,61	7,14	102,07
	2,85	95,02	4,93	98,61	7,18	102,62
	2,87	95,66	4,93	98,61	7,18	102,62
	2,91	96,94	4,93	98,61	7,18	102,62
	Ortalama	95,34	Ortalama	98,41	Ortalama	102,25
	SS	0,88	SS	0,32	SS	0,45
	%BSS	0,93	%BSS	0,33	%BSS	0,44

Çizelge 3.6. Borik asitin UV spektrofotometrik yöntemle PBS ortamındaki miktar tayini yönteminin doğruluk ve geri eldesine ilişkin sonuçlar

Ortam	3 µg/ml		5 µg/ml		7 µg/ml	
PBS ORTAMI	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde	Pratik konsantrasyon (µg/ml)	% Geri Elde
	2,94	98,14	5,13	102,55	7,13	101,84
	2,98	99,35	5,15	102,91	7,11	101,58
	2,94	98,14	5,15	102,91	7,09	101,32
	2,96	98,74	5,16	103,27	7,17	102,36
	2,96	98,74	5,11	102,18	7,17	102,36
	2,96	98,74	5,09	101,82	7,26	103,66
	Ortalama	98,64	Ortalama	102,61	Ortalama	102,18
	SS	0,46	SS	0,54	SS	0,83
	%BSS	0,46	%BSS	0,52	%BSS	0,81

3.3.2. Kesinlik

Etkin maddelerin çeşitli ortamlardaki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğine ilişkin elde edilen bulgular ve ilgili parametreler Çizelge 3.7.-3.12.'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar

HİPERİSİN METANOL ORTAMI		Alan	2 µg/ml	Alan	5 µg/ml	Alan	7 µg/ml
Tekrarlanabilirlik	Gün 1	234,20	1,86	557,40	4,81	757,90	6,64
		233,60	1,85	556,20	4,80	758,30	6,64
		234,30	1,86	558,40	4,82	755,90	6,62
		234,30	1,86	559,70	4,83	758,50	6,64
		234,20	1,86	560,50	4,84	754,30	6,60
		236,40	1,88	560,30	4,83	754,00	6,60
		Ortalama	1,86	Ortalama	4,82	Ortalama	6,62
		SS	0,01	SS	0,02	SS	0,02
		%BSS	0,47	%BSS	0,33	%BSS	0,28
Ara kesinlik	Gün 2	241,30	1,92	564,50	4,87	765,20	6,70
		236,70	1,88	564,80	4,88	766,80	6,72
		240,90	1,92	564,20	4,87	767,30	6,72
		239,90	1,91	563,50	4,86	768,50	6,73
		239,90	1,91	563,00	4,86	766,20	6,71
		240,40	1,92	566,90	4,89	767,10	6,72
	Gün 3	239,60	1,91	566,20	4,89	769,80	6,75
		240,40	1,92	565,60	4,88	771,20	6,76
		241,20	1,92	568,80	4,91	773,60	6,78
		240,70	1,92	568,60	4,91	770,80	6,76
		240,90	1,92	569,90	4,92	770,80	6,76
		241,10	1,92	567,00	4,90	772,70	6,77
	Günler arası	Ortalama	1,90	Ortalama	4,86	Ortalama	6,70
		SS	0,03	SS	0,04	SS	0,06
		%BSS	1,45	%BSS	0,77	%BSS	0,90

Çizelge 3.8. Psödohiperisin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar

PSÖDOHİPERİSİN		Alan	2 µg/ml	Alan	4 µg/ml	Alan	7 µg/ml	
METANOL ORTAMI								
Tekrarlanabilirlik	Gün 1		152,00	2,17	293,20	4,35	461,50	6,95
			152,00	2,17	294,30	4,37	466,30	7,02
			153,20	2,19	292,40	4,34	460,70	6,94
			153,10	2,18	292,20	4,33	465,60	7,01
			152,70	2,18	292,60	4,34	468,70	7,06
			152,10	2,17	292,80	4,34	466,90	7,03
			Ortalama	2,18	Ortalama	4,34	Ortalama	7,00
			SS	0,01	SS	0,01	SS	0,05
			%BSS	0,40	%BSS	0,27	%BSS	0,70
Ara kesinlik	Gün 2		153,90	2,20	293,40	4,35	464,70	7,00
			155,40	2,22	295,40	4,38	466,80	7,03
			155,20	2,22	294,90	4,37	469,10	7,07
			155,40	2,22	295,10	4,38	468,40	7,06
			155,30	2,22	293,30	4,35	469,80	7,08
			158,50	2,27	294,80	4,37	466,90	7,03
	Gün 3		155,80	2,23	295,00	4,38	468,10	7,05
			155,00	2,21	294,80	4,37	470,70	7,09
			156,40	2,24	296,60	4,40	467,70	7,04
			155,20	2,22	293,60	4,35	468,70	7,06
			154,40	2,20	293,70	4,36	467,60	7,04
			154,50	2,21	296,30	4,40	470,30	7,08
	Günler arası		Ortalama	2,21	Ortalama	4,36	Ortalama	7,04
			SS	0,03	SS	0,02	SS	0,04
			%BSS	1,20	%BSS	0,46	%BSS	0,59

Çizelge 3.9. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle PBS ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar

HİPERİSİN PBS ORTAMI		Alan	2 µg/ml	Alan	5 µg/ml	Alan	8 µg/ml
Tekrarlanabilirlik	Gün 1	110,30	2,06	399,50	4,69	761,80	7,98
		110,00	2,05	400,10	4,69	763,10	8,00
		109,90	2,05	399,40	4,69	760,50	7,97
		109,10	2,04	399,20	4,68	760,10	7,97
		109,10	2,04	398,60	4,68	757,80	7,95
		108,50	2,04	398,30	4,68	758,90	7,96
		Ortalama	2,05	Ortalama	4,68	Ortalama	7,97
		SS	0,01	SS	0,01	SS	0,02
		%BSS	0,31	%BSS	0,13	%BSS	0,22
Ara kesinlik	Gün 2	106,50	2,02	392,70	4,63	753,50	7,91
		107,00	2,03	394,00	4,64	753,00	7,90
		105,90	2,02	393,50	4,63	753,70	7,91
		106,30	2,02	392,20	4,62	752,70	7,90
		106,10	2,02	392,30	4,62	752,50	7,90
		105,60	2,01	392,10	4,62	752,60	7,90
	Gün 3	101,00	1,97	380,10	4,51	736,00	7,75
		101,90	1,98	380,90	4,52	736,20	7,75
		100,00	1,96	380,40	4,51	736,90	7,76
		99,60	1,96	379,30	4,50	736,90	7,76
		99,50	1,96	379,20	4,50	736,40	7,75
		99,00	1,95	379,60	4,51	735,40	7,74
	Günler arası	Ortalama	2,01	Ortalama	4,61	Ortalama	7,88
		SS	0,04	SS	0,08	SS	0,09
		%BSS	1,83	%BSS	1,63	%BSS	1,20

Çizelge 3.10. Hiperisin standardının metanol ortamında UV spektrofotometre yöntemiyle miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar

HİPERİSİN METANOL ORTAMI		Abs.	2 µg/ml	Abs.	5 µg/ml	Abs.	8 µg/ml
Tekrarlanabilirlik	Gün 1	0,23	1,98	0,54	4,98	0,85	8,00
		0,24	2,02	0,54	4,98	0,87	8,16
		0,24	2,07	0,54	4,97	0,87	8,14
		0,24	2,01	0,55	5,06	0,88	8,22
		0,24	2,01	0,55	5,07	0,88	8,25
		0,24	2,01	0,55	5,07	0,88	8,23
		Ortalama	2,01	Ortalama	5,02	Ortalama	8,17
		SS	0,03	SS	0,05	SS	0,09
		%BSS	1,41	%BSS	1,00	%BSS	1,13
	Ara kesinlik	Gün 2	0,23	2,00	0,54	4,97	0,86
0,24			2,04	0,54	4,92	0,86	8,05
0,24			2,07	0,54	4,93	0,86	8,06
0,24			2,05	0,55	5,01	0,86	8,07
0,24			2,05	0,54	5,00	0,86	8,07
0,24			2,07	0,55	5,03	0,88	8,23
Gün 3		0,24	2,01	0,55	5,03	0,87	8,10
		0,24	2,05	0,55	5,05	0,87	8,12
		0,24	2,07	0,55	5,04	0,87	8,11
		0,24	2,08	0,55	5,04	0,88	8,23
		0,24	2,09	0,55	5,08	0,88	8,26
		0,24	2,09	0,55	5,03	0,88	8,26
Günler arası		Ortalama	2,04	Ortalama	5,01	Ortalama	8,15
		SS	0,03	SS	0,05	SS	0,08
		%BSS	1,61	%BSS	0,95	%BSS	1,04

Çizelge 3.11. Borik asitin %1,5 (h/h) asetik asit ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar

BORİK ASİT %1,5 A.ASİT ORTAMI							
	Abs.	3 µg/ml	Abs.	5 µg/ml	Abs.	7 µg/ml	
Tekrarlanabilirlik	Gün 1	0,23	2,93	0,34	4,99	0,45	7,18
		0,23	2,89	0,34	4,99	0,44	6,99
		0,23	2,95	0,34	4,99	0,44	6,99
		0,23	2,89	0,34	4,99	0,44	6,93
		0,23	2,93	0,34	4,99	0,44	6,93
		0,23	2,95	0,34	5,03	0,45	7,13
		Ortalama	2,92	Ortalama	4,99	Ortalama	7,03
		SS	0,03	SS	0,02	SS	0,10
		%BSS	0,90	%BSS	0,31	%BSS	1,49
Ara kesinlik	Gün 2	0,23	2,97	0,34	5,01	0,45	7,16
		0,23	3,00	0,34	5,01	0,45	7,18
		0,24	3,04	0,34	5,10	0,45	7,18
		0,24	3,06	0,34	5,12	0,45	7,18
		0,24	3,06	0,34	5,12	0,45	7,18
		0,23	2,99	0,34	5,10	0,45	7,18
	Gün 3	0,23	2,95	0,34	5,10	0,45	7,18
		0,23	2,95	0,34	5,10	0,45	7,18
		0,23	2,97	0,34	5,10	0,45	7,18
		0,23	2,97	0,34	5,10	0,45	7,18
		0,23	2,95	0,34	5,12	0,45	7,18
		0,23	2,93	0,34	5,12	0,45	7,18
	Günler arası	Ortalama	2,96	Ortalama	5,06	Ortalama	7,13
		SS	0,05	SS	0,06	SS	0,09
		%BSS	1,72	%BSS	1,17	%BSS	1,32

Çizelge 3.12. Borik asitin PBS ortamında miktar tayini yönteminin kesinliğine ilişkin sonuçlar

BORİK ASİT PBS ORTAMI		Abs.	3 µg/ml	Abs.	5 µg/ml	Abs.	7 µg/ml
Tekrarlanabilirlik	Gün 1	0,21	2,91	0,33	5,11	0,45	7,17
		0,21	2,93	0,33	5,11	0,45	7,17
		0,21	2,93	0,33	5,15	0,44	7,15
		0,22	2,98	0,34	5,16	0,45	7,18
		0,21	2,89	0,33	5,09	0,44	7,04
		0,21	2,94	0,33	5,11	0,44	7,04
		Ortalama	2,93	Ortalama	5,12	Ortalama	7,12
	SS	0,03	SS	0,03	SS	0,07	
	%BSS	1,07	%BSS	0,53	%BSS	0,94	
	Ara kesinlik	Gün 2	0,21	2,91	0,33	5,13	0,44
0,21			2,91	0,33	5,13	0,44	7,06
0,21			2,93	0,34	5,16	0,45	7,17
0,21			2,94	0,34	5,16	0,45	7,17
0,22			2,98	0,34	5,18	0,45	7,17
0,21			2,96	0,34	5,18	0,44	7,15
Gün 3		0,21	2,96	0,33	5,15	0,44	6,98
		0,21	2,96	0,33	5,15	0,44	7,00
		0,21	2,94	0,34	5,16	0,45	7,17
		0,21	2,94	0,34	5,16	0,44	7,15
		0,21	2,91	0,34	5,16	0,44	7,02
		0,22	3,00	0,34	5,18	0,44	7,07
Günler arası		Ortalama	2,94	Ortalama	5,15	Ortalama	7,10
		SS	0,03	SS	0,03	SS	0,07
		%BSS	1,03	%BSS	0,55	%BSS	0,97

3.3.3. Teşhis Sınırı (DL) ve Tayin Sınırı (QL)

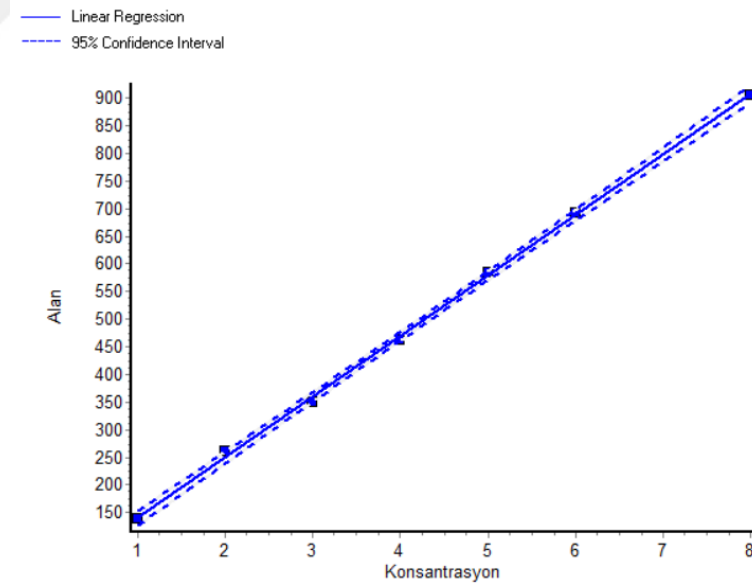
İncelenen etkin maddelerim tüm ortamlarda elde edilen kalibrasyon verileri ile hesaplanan DL ve QL verileri Çizelge 3.13'te yer almaktadır.

Çizelge 3.13. Etkin maddelerin miktar tayini yönteminin DL ve QL değerlerine ait bulgular

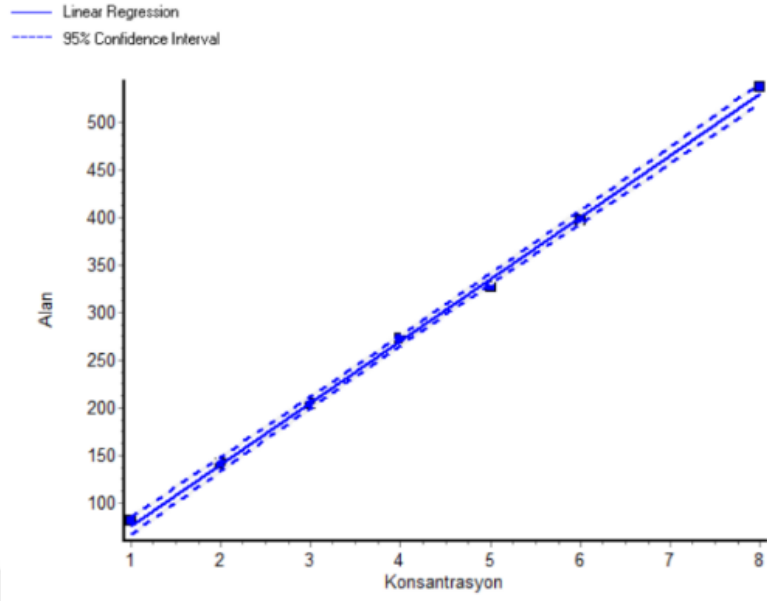
Yöntem	Etkin madde	Ortam	DL (µg/ml)	QL (µg/ml)	Alt sınır (µg/ml)
HPLC	Hiperisin	Metanol	0,261	0,792	1
HPLC	Psödohiperisin	Metanol	0,290	0,878	1
HPLC	Hiperisin	PBS	0,128	0,388	2
UV Spektrofotometre	Hiperisin	Metanol	0,206	0,625	1
UV Spektrofotometre	Borik asit	%1,5 (h/h) asetik asit	0,427	1,294	2
UV Spektrofotometre	Borik asit	PBS	0,345	1,045	2

3.3.4. Doğrusallık

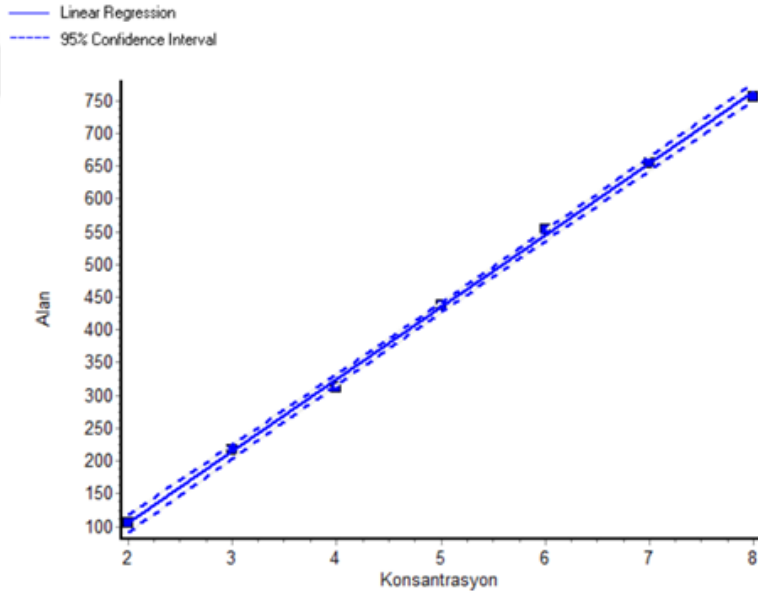
Etkin maddelerin hazırlanan konsantrasyonlara karşılık gelen alan/absorbans değerleri Instat GraphPad (Version 3.05) programı kullanılarak %95 güven aralığını da gösteren kalibrasyon doğrusu çizilmiş (Şekil 3.14.-3.19) ve Çizelge 3.14.'te bu kalibrasyon parametreleri gösterilmiştir.



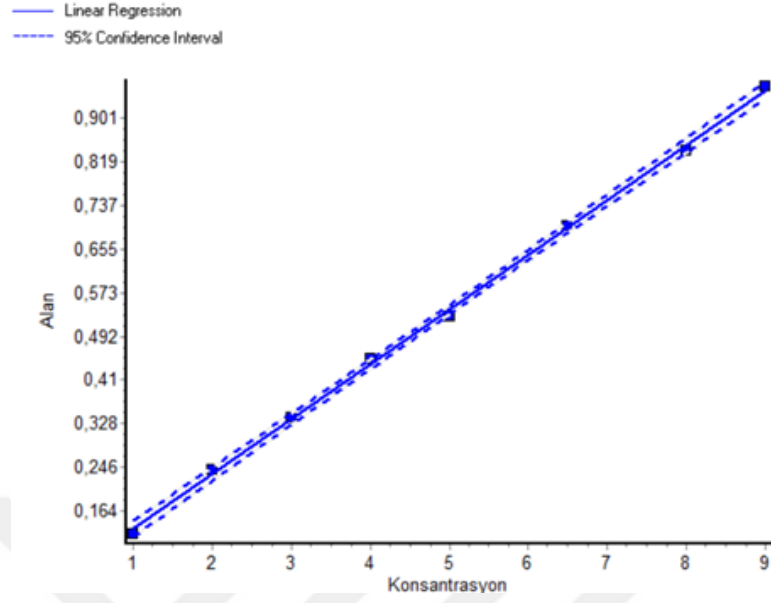
Şekil 3.14. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği



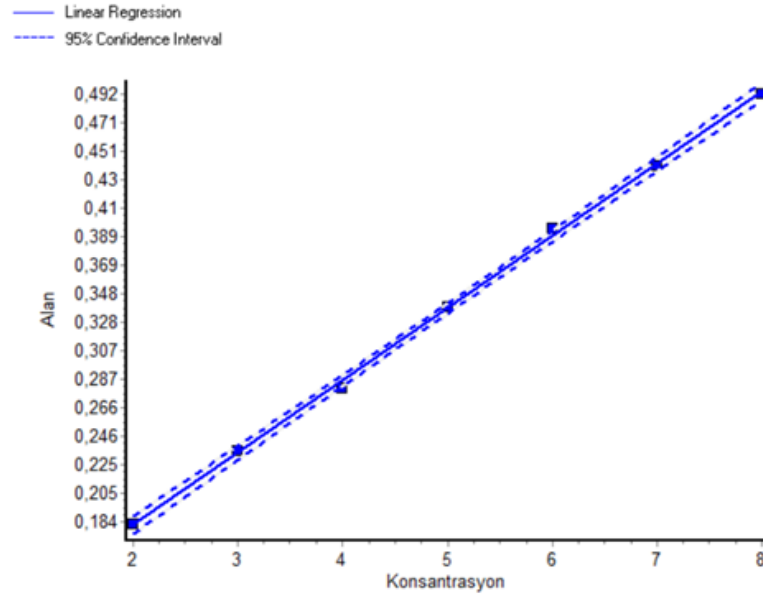
Şekil 3.15. Psödohiperin standardının HPLC yöntemiyle metanol ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği



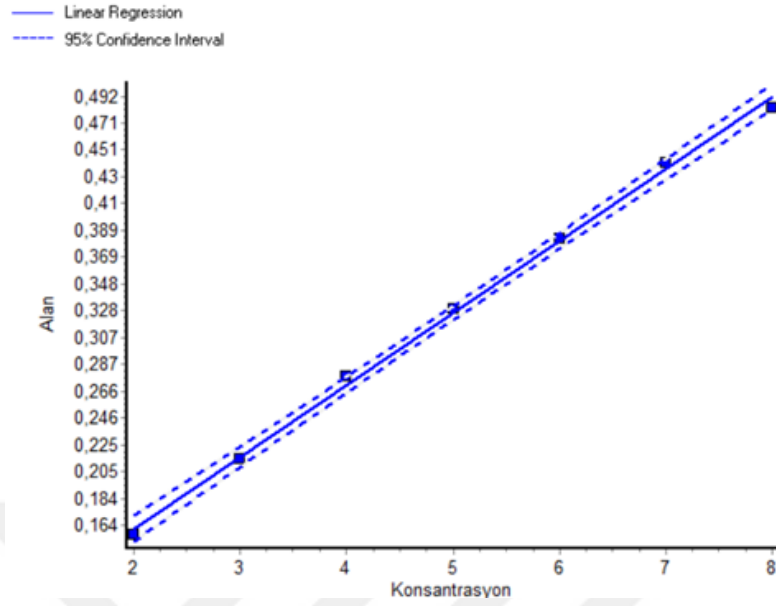
Şekil 3.16. Hiperisin standardının HPLC yöntemiyle PBS ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği



Şekil 3.17. Hiperisin standardının metanol ortamındaki UV spektrofotometre yöntemiyle %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği



Şekil 3.18. Borik asitin %1,5 (h/h) asetik asit ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği



Şekil 3.19. Borik asitin PBS ortamındaki %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon grafiği

Çizelge 3.14. Etkin maddelerin çeşitli ortamlarda %95 olasılıkla güven aralıklarının yer aldığı kalibrasyon parametreleri

Yöntem	Etkin madde	Ortam	m	n	r ²	Sy.x
HPLC	Hiperisin	Metanol	109,5874	30,5235	0,9992	7,935
HPLC	Psödohiperisin	Metanol	64,7314	11,7079	0,9990	5,509
HPLC	Hiperisin	PBS	109,8702	-115,4893	0,9991	7,677
UV Spektrofotometre	Hiperisin	Metanol	0,1034	0,0274	0,9990	0,009
UV Spektrofotometre	Borik asit	%1,5 (h/h) asetik asit	0,0519	0,0780	0,9991	0,004
UV Spektrofotometre	Borik asit	PBS	0,0550	0,0512	0,9981	0,006

m: eğim; n: kesişim; r²: Determinasyon Katsayısı; Sy.x: Regresyon doğrusundan olan sapmalara ait standart hata

3.3.5. Seçicilik

Seçicilik testi için formülasyonda kullanılan maddelerin tek başına ve etkin maddeler ile hazırlanan karışımları geliştirilen analiz yöntemi ile analiz edilmiş, girişim olmadığı tespit edilmiştir. Girişim olmadığı tespit edildiğinden burada kromotogram ve UV-Vis spektrum verilmemiştir.

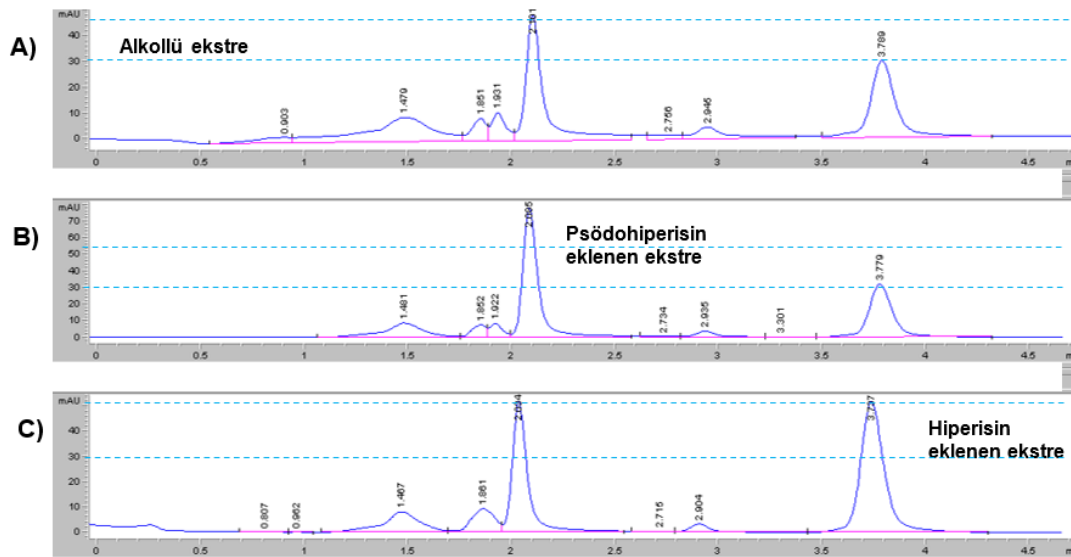
3.4. *H.perforatum*'un Alkollü Ekstresinin Farmakope Standartlarına Uygunluğunun Değerlendirilmesine Ait Bulgular

3.4.1. *H.perforatum*'un Alkollü Ekstresinden UV-Vis Spektrofotometre ile Total Hiperisin Tayini

Soxhlet ekstraksiyonuyla hazırlanıp liyofilize edilen kuru ekstrelerden 16 ayrı ekstraksiyonun ayrı ayrı analizleri yapılmış, %total hiperisin miktarı minimum %0,19 maksimum %0,27 aralığında ve ortalaması $0,26 \pm 0,04$ ($n=16$) bulunmuştur. Liyofilize ekstrelerin birleştirilmesiyle elde edilen kuru ekstredeki total hiperisin miktarı $0,21 \pm 0,00$ ($n=3$) olarak tespit edilmiştir.

3.4.2. *H.perforatum*'un Alkollü Ekstresinden HPLC ile Hiperisin Tayini

Farmakope yöntemiyle analiz edilen alkollü ekstre ve standart ilave edilmiş ekstre kromatogramları Şekil 3.20.'de gösterilmiştir.



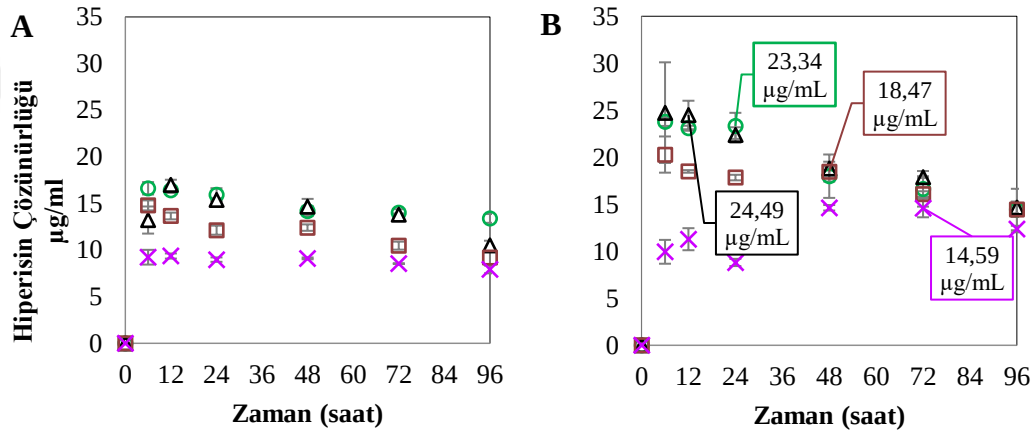
Şekil 3.20. Farmakope yöntemiyle analiz edilen alkollü ekstre (A) ve psödohiperisin standardı ilave edilmiş ekstre (B) ve hiperisin standardı ilave edilmiş ekstre (C) kromatogramları

H.perforatum ekstresinin HPLC metodu ile de $0,09 \pm 0,00$ 'nın psödohiperisin ve $0,06 \pm 0,00$ 'ının hiperisin bileşenlerinden oluştuğu saptanmıştır. Ayrıca soxhlet ekstraksiyonuyla hazırlanıp liyofilize edilen 16 ayrı ekstraksiyonda analizler yapılmış, % hiperisin miktarı minimum %0,07 maksimum %0,09 aralığında ve ortalaması $0,08 \pm 0,01$

bulunmuştur. %Psödohiperisin miktarı minimum %0,11 maksimum %0,14 aralığında ve ortalaması $0,13 \pm 0,01$ bulunmuştur.

3.5. *H.perforatum*'un Alkollü Ekstresinin Farklı Çözünme Ortamlarında Çözünürlük Çalışmasına Ait Bulgular

Çeşitli ortamlardaki hiperisin çözünürlüğüne ait bulgular Şekil 3.21.'de verilmiştir. 50 µg hiperisine eşdeğer liyofilize ekstrede denge çözünme sonuçları etanol içeren PBS ortamı için farklı saatlerde dengeye ulaşmıştır ve 23,34 µg/ml $\pm 1,39$ (24.sa) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.21. Çeşitli çözücü ortamlardaki hiperisin çözünürlüğü ($n=3$): A) 25 µg hiperisine eşdeğer liyofilize bitki ekstresi, B) 50 µg hiperisine eşdeğer liyofilize bitki ekstresi (PBS (pH 7,4) ortamı (■); %0,2 h/h Tween 80 içeren PBS ortamı (×); %25 h/h metanol içeren PBS ortamı (Δ); %25 h/h etanol içeren PBS ortamı (●)($n=3$))

3.6. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

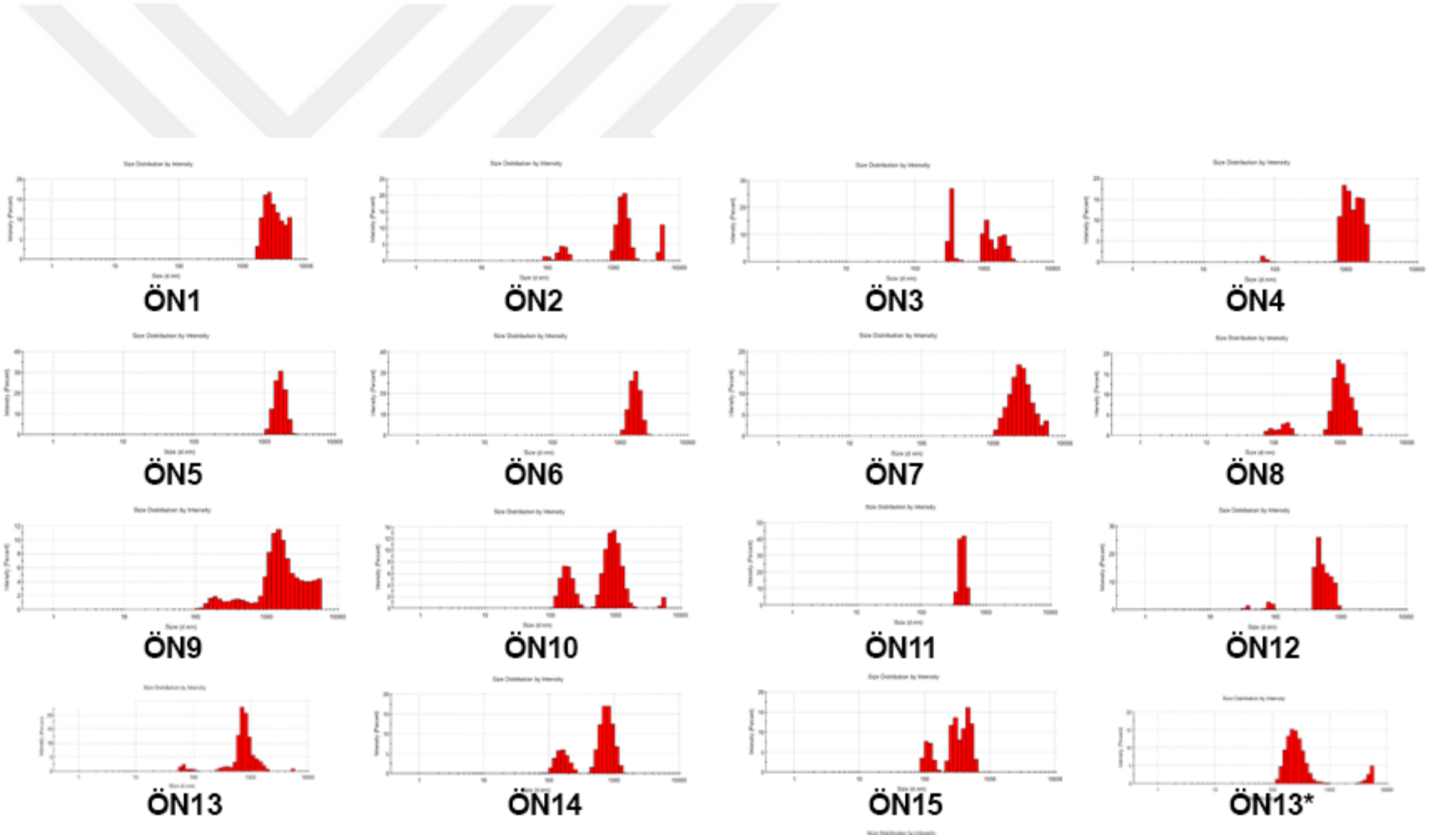
3.6.1. Nanopartikül Formülasyonlarında Ortalama Partikül Büyüklüğü, Partikül Büyüklüğü Dağılımları, Zeta Potansiyel, Etkin Madde Yükleme Etkinliği ve Etkin Madde Yükleme Kapasitesi Bulguları

Önformülasyon denemelerinde hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü (PB), büyüklük dağılımı (PDI), zeta potansiyeli (ZP) ölçümleri ve etkin madde yükleme etkinliği (%EE) analizleri Bölüm 2.2.8.2.1. ve 2.2.8.2.2.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular Çizelge 3.15. ve Şekil 3.22.'de verilmiştir.

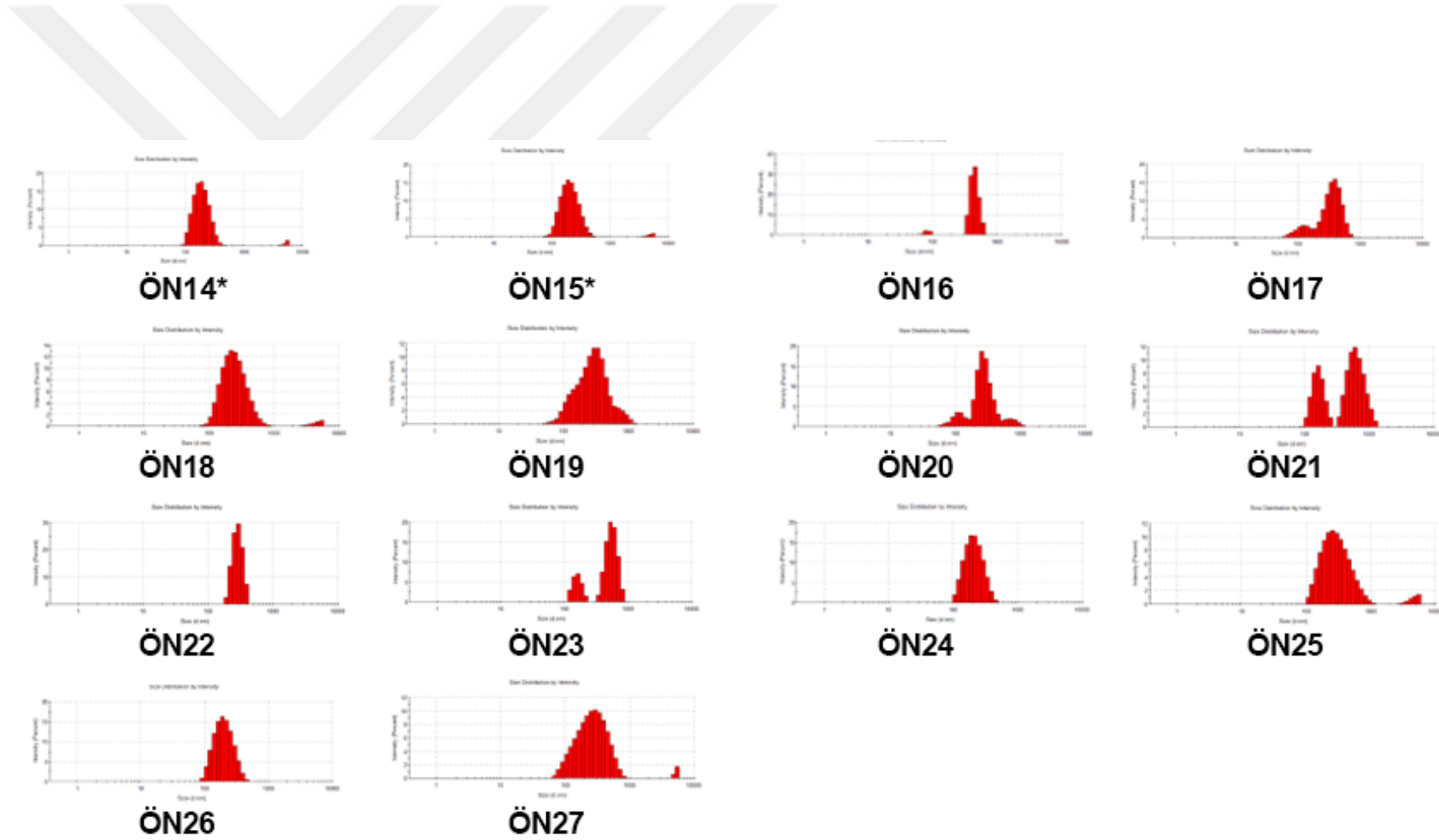
Çizelge 3.15. Partikül formülasyonlarının ortalama PB, PDI, ZP ve %EE sonuçları

	Partikül büyüklüğü (nm) ± SS (n=3)	PDI ± SS (n=3)	ZP (mV) ± SS (n=3)	EE (%) ± SS (n=3)
ÖN1	5077,00 ± 468,00	0,34 ± 0,06	-36,80 ± 0,31	78,22 ± 4,16
ÖN2	4587,00 ± 549,00	0,50 ± 0,04	-41,20 ± 0,85	85,91 ± 0,61
ÖN3	5278,00 ± 395,00	0,51 ± 0,03	-42,53 ± 1,00	86,38 ± 0,76
ÖN4	3724,00 ± 9,24	0,67 ± 0,22	-38,67 ± 1,53	96,43 ± 1,00
ÖN5	3617,00 ± 418,00	0,44 ± 0,10	-41,33 ± 1,88	102,0 ± 3,06
ÖN6	3540,00 ± 282,00	0,43 ± 0,04	-38,20 ± 3,99	91,78 ± 2,08
ÖN7	2947,00 ± 417,00	0,28 ± 0,21	-41,73 ± 0,80	93,42 ± 2,17
ÖN8	2929,00 ± 946,00	0,80 ± 0,24	-27,93 ± 0,55	86,18 ± 0,14
ÖN9	1532,00 ± 167,00	0,57 ± 0,16	-21,70 ± 2,08	76,05 ± 0,25
ÖN10	580,90 ± 3,81	0,76 ± 0,01	-22,23 ± 0,29	80,38 ± 0,06
ÖN11	951,00 ± 97,80	0,55 ± 0,08	-25,23 ± 0,46	83,81 ± 0,01
ÖN12	1781,00 ± 192,00	0,86 ± 0,06	-28,90 ± 0,75	89,50 ± 0,02
ÖN13	1891,00 ± 325,66	0,85 ± 0,05	-27,83 ± 1,52	85,29 ± 0,34
ÖN14	1065,20 ± 148,88	0,92 ± 0,07	-17,50 ± 1,45	85,50 ± 0,21
ÖN15	1361,67 ± 207,52	0,88 ± 0,03	-17,03 ± 1,14	83,06 ± 0,31
ÖN13*	624,53 ± 46,78	0,60 ± 0,12	-34,57 ± 0,45	85,29 ± 0,34
ÖN14*	212,90 ± 4,65	0,32 ± 0,01	-30,43 ± 0,80	85,50 ± 0,21
ÖN15*	202,00 ± 1,44	0,20 ± 0,01	-23,33 ± 0,32	83,06 ± 0,31
ÖN16	947,70 ± 124,40	0,64 ± 0,41	-24,93 ± 0,15	100,05 ± 0,21
ÖN17	607,20 ± 40,95	0,67 ± 0,11	-21,43 ± 0,32	99,37 ± 0,21
ÖN18	580,80 ± 90,36	0,57 ± 0,04	-31,60 ± 0,58	84,73 ± 1,04
ÖN19	451,70 ± 0,42	0,20 ± 0,01	-29,6 ± 0,51	82,69 ± 0,46
ÖN20	826,40 ± 29,81	0,74 ± 0,03	-29,00 ± 0,75	94,15 ± 0,01
ÖN21	1045,00 ± 67,24	0,75 ± 0,02	-35,80 ± 0,40	92,27 ± 0,12
ÖN22	1274,00 ± 143,40	0,84 ± 0,03	-28,10 ± 0,40	78,59 ± 0,32
ÖN23	1085,00 ± 272,70	0,74 ± 0,05	-31,90 ± 2,15	86,15 ± 0,98
ÖN24	176,70 ± 1,59	0,11 ± 0,03	-13,87 ± 0,38	94,97 ± 0,31
ÖN25	197,24 ± 2,34	0,06 ± 0,04	-15,97 ± 0,45	95,03 ± 0,25
ÖN26	204,86 ± 1,21	0,08 ± 0,02	-15,10 ± 0,69	92,36 ± 0,74
ÖN27	215,08 ± 2,69	0,07 ± 0,04	-17,03 ± 0,84	96,25 ± 0,09

*Taze partikül süspansiyonu; SS: Standart sapma



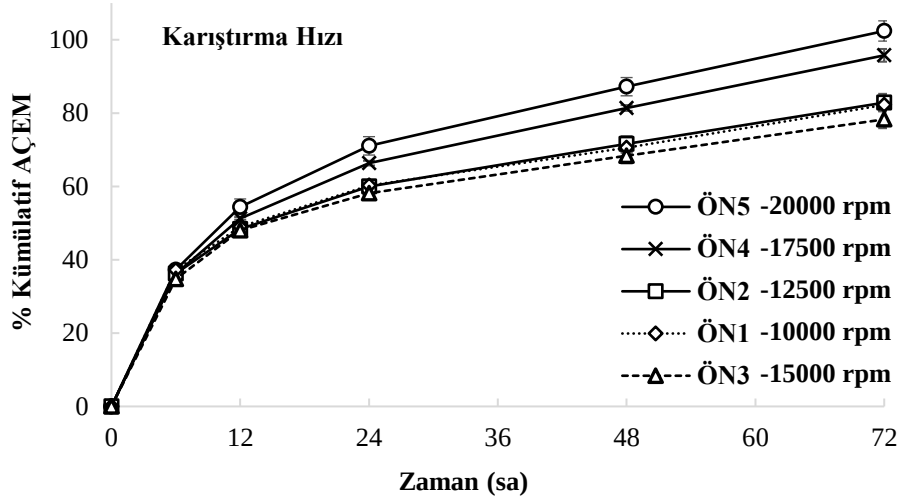
Şekil 3.22. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü dağılımları



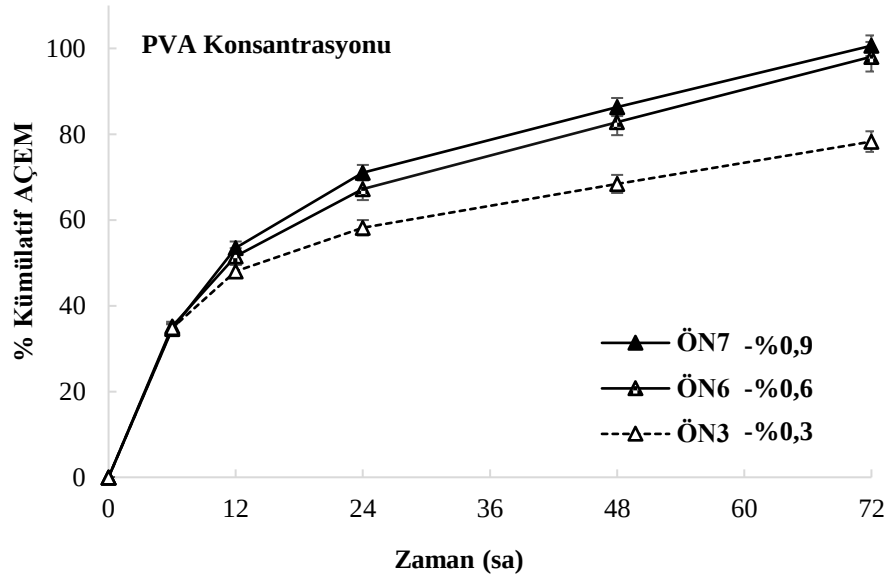
Şekil 3.22. Devam. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü dağılımları

3.6.1.1. Etkin Maddenin Nanopartiküllerden *In Vitro* Salımına Ait Bulgular

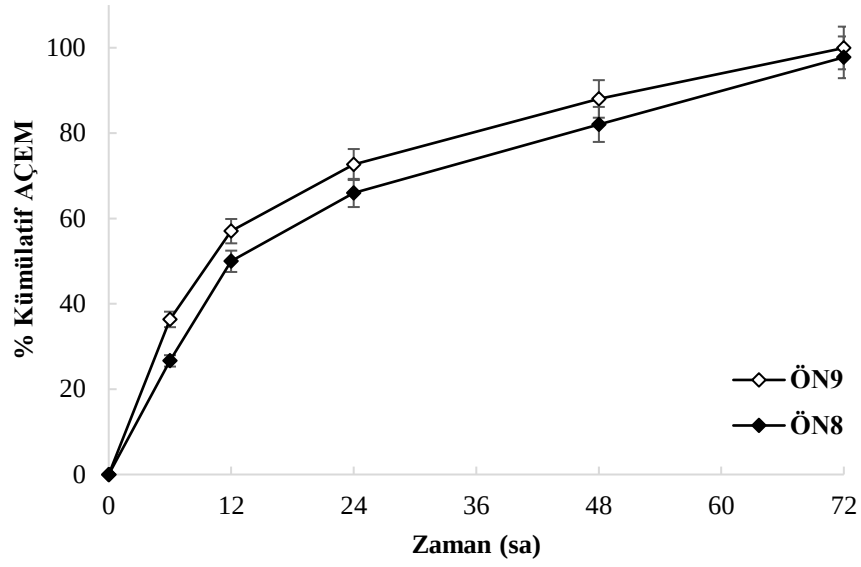
Önformülasyon denemelerinde hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında *in vitro* etkin madde salımına ait analizler Bölüm 2.2.8.2.6.'da açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 3.23.-3.31.'de verilmiştir.



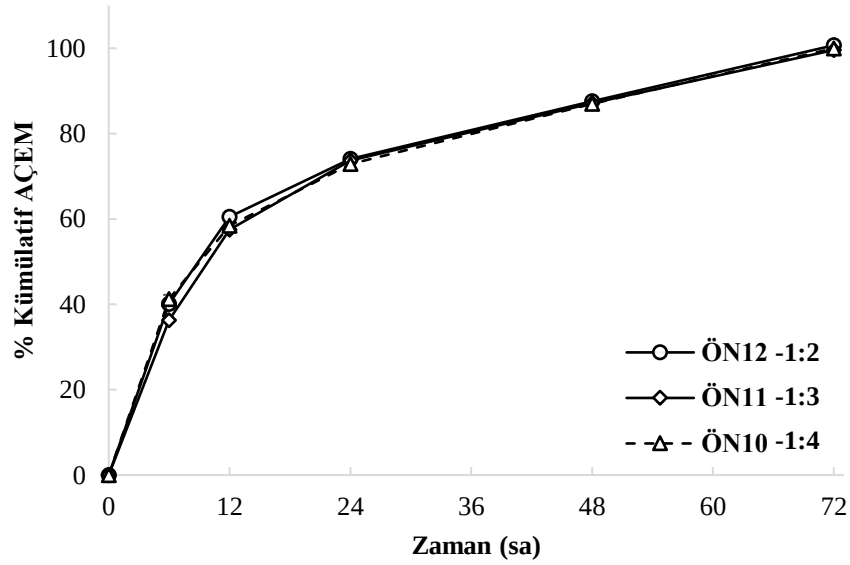
Şekil 3.23. Farklı karıştırma hızı (ÖN1-ÖN5) ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)



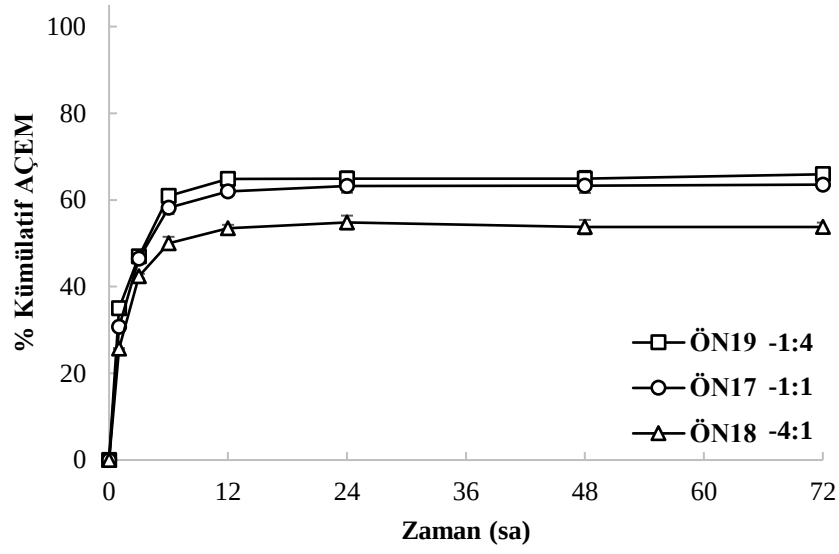
Şekil 3.24. Farklı PVA konsantrasyonu (ÖN3, ÖN6-7) ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)



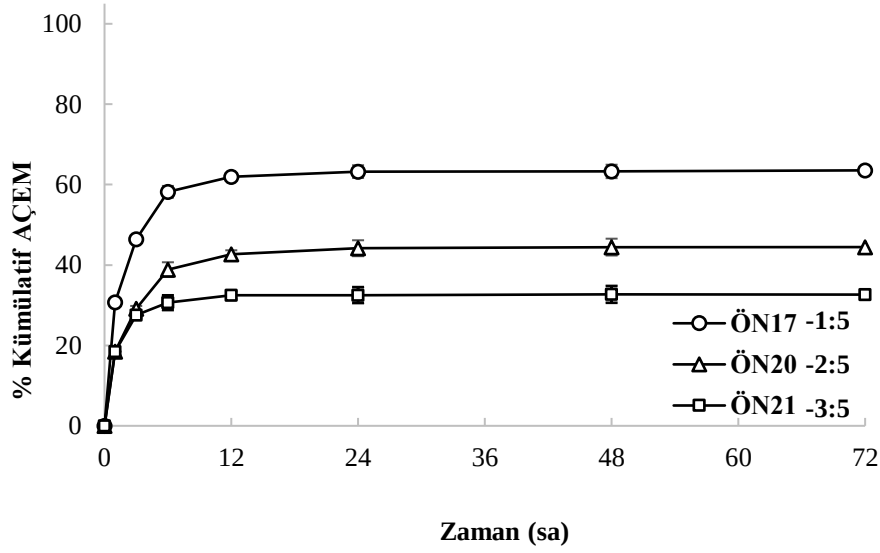
Şekil 3.25. Orta (ÖN8) ve yüksek karıştırma hızı (ÖN9) sabit tutulurken ek karıştırma olarak prob sonikasyon uygulaması ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı ($n=3$)



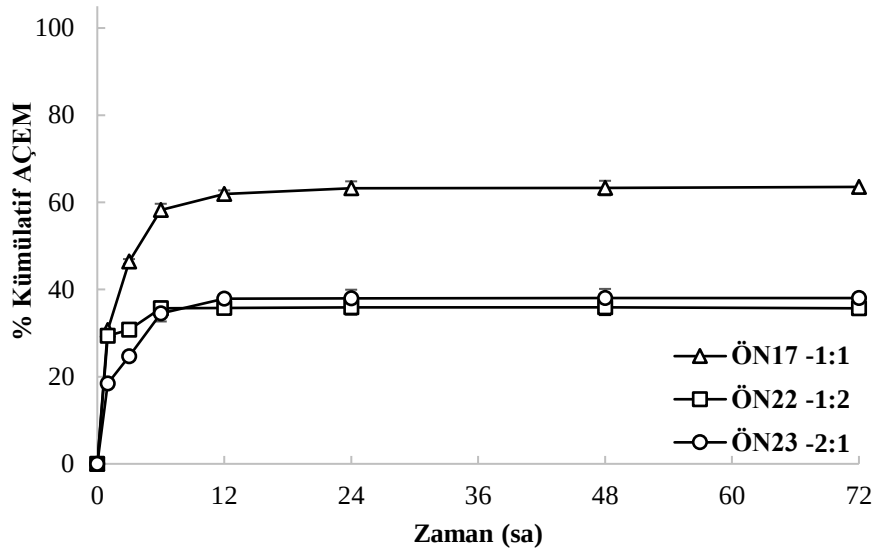
Şekil 3.26. Yağ fazı: Su fazı hacmi (ÖN10-12) değiştirilerek hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı ($n=3$)



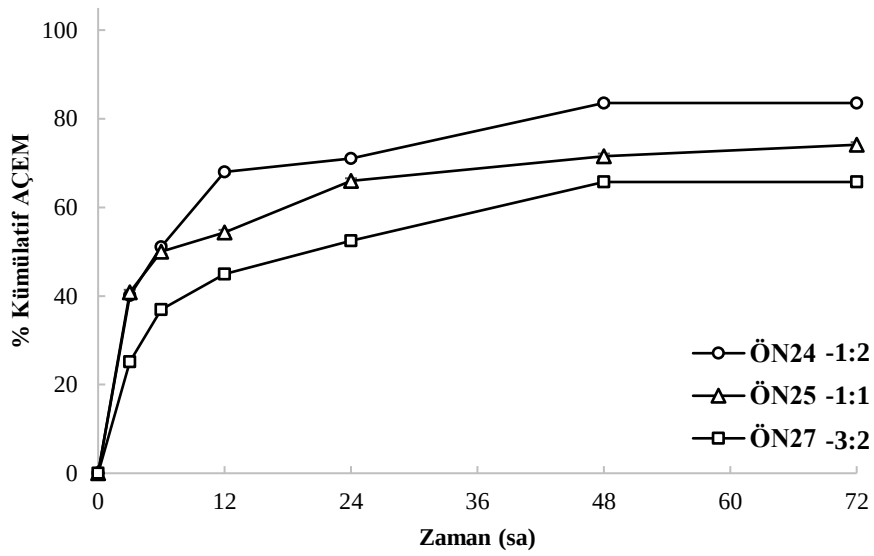
Şekil 3.27. Kriyoprotektan varlığında farklı DCM:Etanol oranı (ÖN17-19) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)



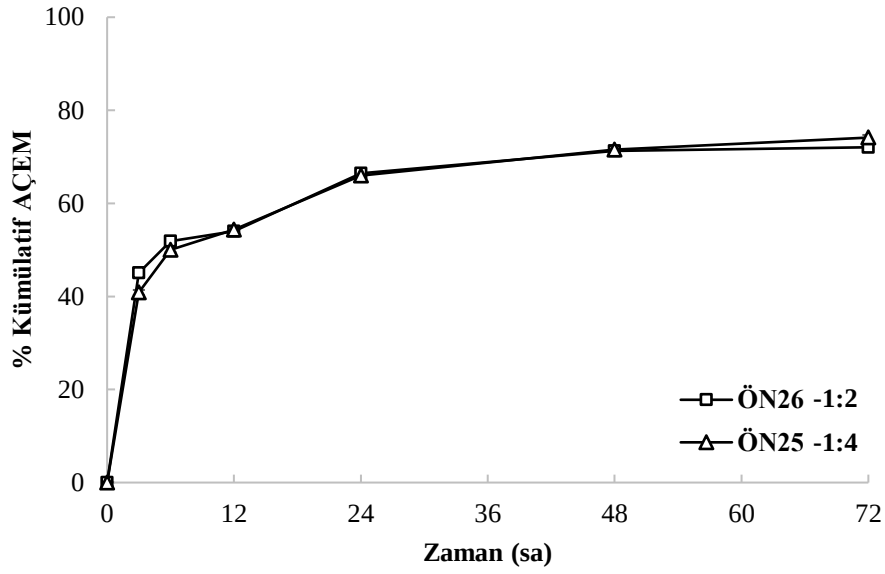
Şekil 3.28. Kriyoprotektan varlığında farklı yağ fazı: su fazı hacmi (ÖN17, 20-21) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)



Şekil 3.29. Kriyoprotektan varlığında farklı polimer:liyofilize ekstre oranı (ÖN17,22-23) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)



Şekil 3.30. Organik faz bileşeni DCM yerine aseton kullanılarak farklı polimer: liyofilize ekstre oranı (ÖN24-25, 27) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)



Şekil 3.31. Organik faz bileşeni DCM yerine aseton kullanılarak farklı yağ fazı:su fazı hacmi oranı (ÖN25-26) kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında % kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı (n=3)

3.6.1.2. Optimum Nanopartikül Formülasyonunun DoE ile Belirlenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.8.3.'te açıklandığı şekilde Design-Expert yazılımı (sürüm 13.0.5.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak üç seviye ve üç tekrarla toplam yirmi yedi nanopartikül çalışmasına ait DoE verileri Çizelge 3.16.'da gösterilmektedir. Değişkenler arasındaki ilişkileri daha detaylı incelemek amacıyla yapılan çoklu regresyon analizi sonuçları Çizelge 3.17.'de özetlenmiştir. Buna ek olarak, bağımsız faktörler arasındaki etkileşimleri ve bunların yanıtlar üzerindeki etkilerini tespit etmek amacıyla CCD tasarım kullanılarak oluşturulan 3B RSM grafikleri Şekil 3.32.'de gösterilmiştir.

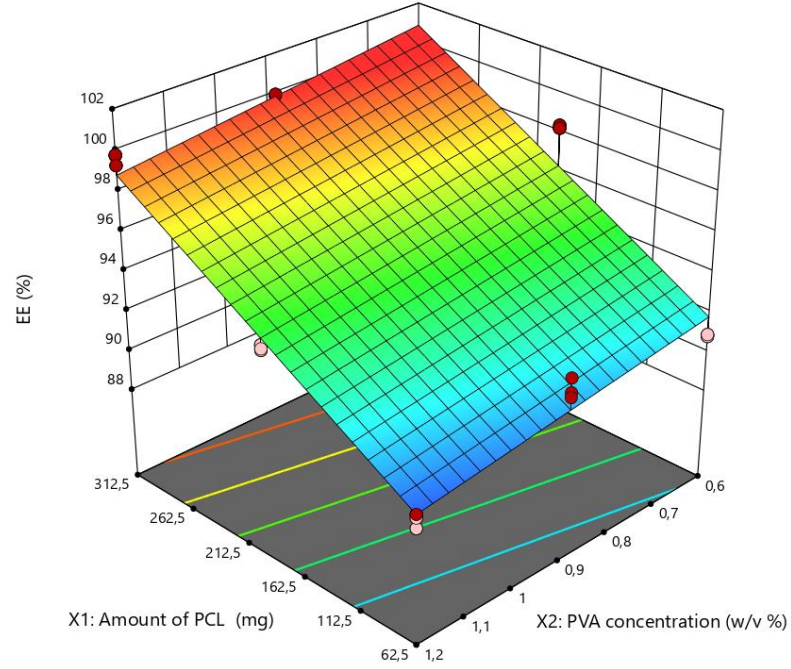
Çizelge 3.16. CCD metoduyla elde edilen liyofilize *H.perforatum* ekstresi yüklü nanopartiküllere ait DoE verileri

No	X ₁ (PCL Miktarı)	X ₂ (PVA Konsantrasyonu)	Y ₁ (%EE)	Y ₂ (PB)	Y ₃ (PDI)	Y ₄ (ZP)	Y ₅ (%LC)	Y ₆ (%AÇEM 48.sa)
1	187,5	0,9	94,16	218,49	0,11	-17,87	10,06	49,22
2	187,5	0,9	94,41	213,11	0,03	-16,19	10,10	49,60
3	187,5	1,2	94,01	279,80	0,24	-6,52	8,85	39,74
4	62,5	0,9	92,43	176,70	0,11	-13,87	11,75	85,77
5	312,5	0,6	99,92	243,20	0,20	-23,7	9,04	30,20
6	187,5	1,2	93,74	281,04	0,26	-6,64	8,82	40,33
7	187,5	1,2	93,82	278,56	0,22	-6,4	8,83	40,94
8	187,5	0,6	98,28	230,96	0,18	-10,95	9,22	46,18
9	187,5	0,6	98,28	223,44	0,14	-10,25	9,22	46,63
10	187,5	0,9	94,23	215,80	0,07	-17,03	10,07	48,87
11	312,5	1,2	99,82	260,82	0,18	-19,91	8,85	28,33
12	312,5	1,2	99,31	252,98	0,16	-18,89	8,79	29,36
13	312,5	0,6	99,89	245,79	0,22	-24,15	9,04	34,03
14	312,5	0,6	99,80	240,61	0,18	-23,25	9,03	34,03
15	312,5	0,9	99,89	226,30	0,10	-19	9,02	24,22
16	62,5	1,2	89,15	260,85	0,35	-6,51	10,98	81,89
17	62,5	1,2	89,66	253,95	0,33	-5,33	11,07	85,72
18	62,5	0,9	91,70	178,29	0,14	-14,25	11,62	86,37
19	62,5	0,9	91,46	175,11	0,08	-13,49	11,58	86,99
20	62,5	1,2	89,83	257,40	0,34	-5,92	11,10	78,21
21	62,5	0,6	90,83	191,33	0,13	-8,75	11,05	82,33
22	62,5	0,6	90,93	184,47	0,07	-8,39	11,07	85,30
23	187,5	0,6	98,42	227,20	0,16	-10,6	9,24	45,74
24	312,5	0,9	99,95	232,43	0,12	-19,25	9,02	23,92
25	312,5	0,9	99,64	220,17	0,08	-18,75	8,98	23,92
26	312,5	1,2	99,79	256,90	0,17	-19,4	8,85	26,26
27	62,5	0,6	90,88	187,90	0,10	-8,57	11,06	79,47

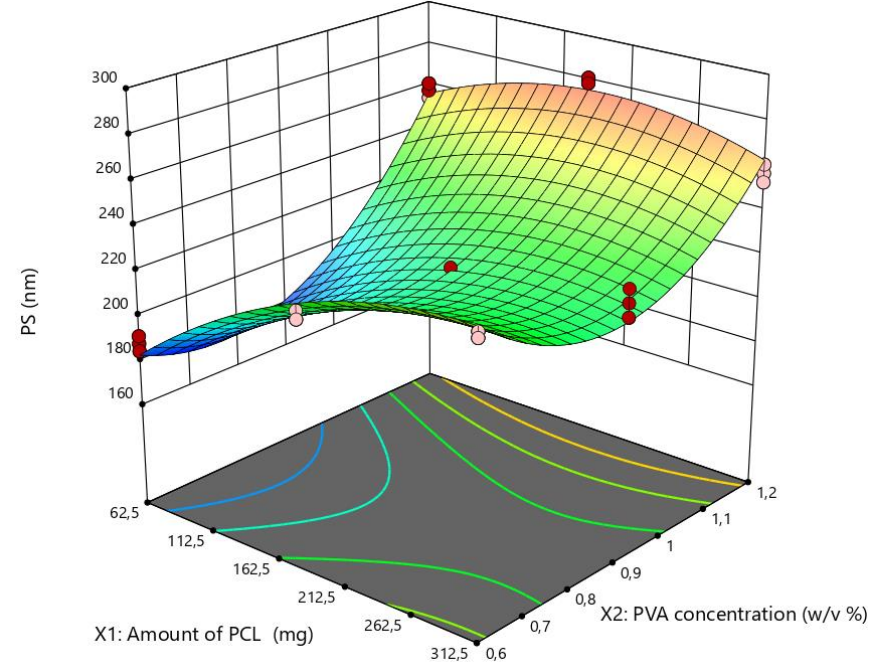
Çizelge 3.17. CCD metoduyla elde edilen liyofilize *H.perforatum* ekstresi yüklü nanopartiküllere çoklu regresyon analizi sonuçları

YANIT	Model Eşitliği	p-Value	Adjusted R ²	Predicted R ²	Adequate Precision	Significant Terms	Eşitlik
Y₁ (%EE)	Linear	p<0,0001	0,9266	0,9156	30,6628	X ₁ (p<0,0001) X ₂ (p=0,0006)	$Y_1 = 91,59361 + 0,036063 * X_1 - 3,34794 * X_2$
Y₂ (PB)	Quadratic	p<0,0001	0,9615	0,9492	31,0912	X ₁ (p<0,0001) X ₂ (p<0,0001) X ₁ X ₂ (p<0,0001)	$Y_2 = 346,04167 + 0,862800 * X_1 - 570,80556 * X_2 - 0,372000 * X_1X_2 - 0,0010368 * X_1^2 + 397,77778 * X_2^2$
Y₃ (PDI)	Quadratic	p<0,0001	0,9124	0,8864	21,3382	X ₁ (p=0,0340) X ₂ (p<0,0001) X ₁ X ₂ (p<0,0001)	$Y_3 = 0,660694 + 0,001193 * X_1 - 1,66806 * X_2 - 0,001800 * X_1X_2 + 8,53333E-07 * X_1^2 + 1,20370 * X_2^2$
Y₄ (ZP)	Quadratic	p<0,0001	0,8154	0,7618	13,6772	X ₁ (p<0,0001) X ₂ (p=0,0071)	$Y_4 = 19,93014 + 0,033753 * X_1 - 79,56806 * X_2 + 0,011000 * X_1X_2 - 0,000236 * X_1^2 + 46,46296 * X_2^2$
Y₅ (% LC)	Quadratic	p<0,0001	0,9564	0,9445	28,5055	X ₁ (p<0,0001)	$Y_5 = 8,03853 - 0,025397 * X_1 + 11,37411 * X_2 - 0,001317 * X_1X_2 + 0,000046 * X_1^2 - 6,37104 * X_2^2$
Y₆ (%AÇEM 48.sa)	Quadratic	p<0,0001	0,9790	0,9718	36,5653	X ₁ (p<0,0001) X ₂ (p=0,0344)	$Y_6 = 100,661 - 0,450931 * X_1 + 24,93297 * X_2 - 0,0289831 * X_1X_2 + 0,000682111 * X_1^2 - 14,2427 * X_2^2$

A)

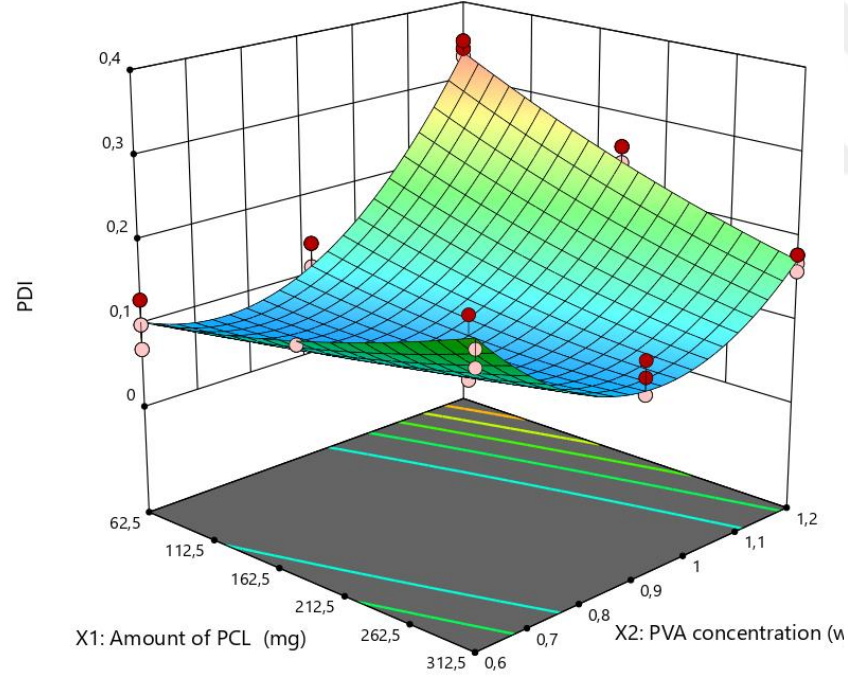


B)

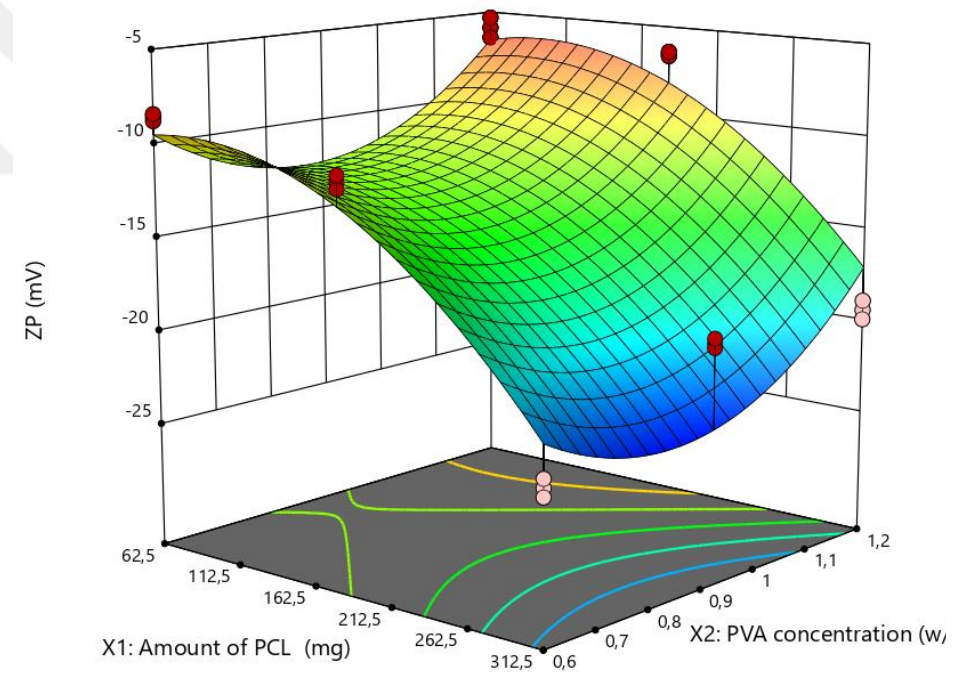


Şekil 3.32. X_1 (PCL Miktarı) ve X_2 (PVA Konsantrasyonu) değişkenlerinin CCD tasarımıyla elde edilen RSM grafikleri; (A) Y_1 (%Enkapsülasyon etkinliği), (B) Y_2 (Partikül büyüklüğü), (C) Y_3 (PDI), (D) Y_4 (Zeta potansiyel), (E) Y_5 (%Etkin madde yükleme kapasitesi), (F) Y_6 (%AÇEM 48.sa)

C)

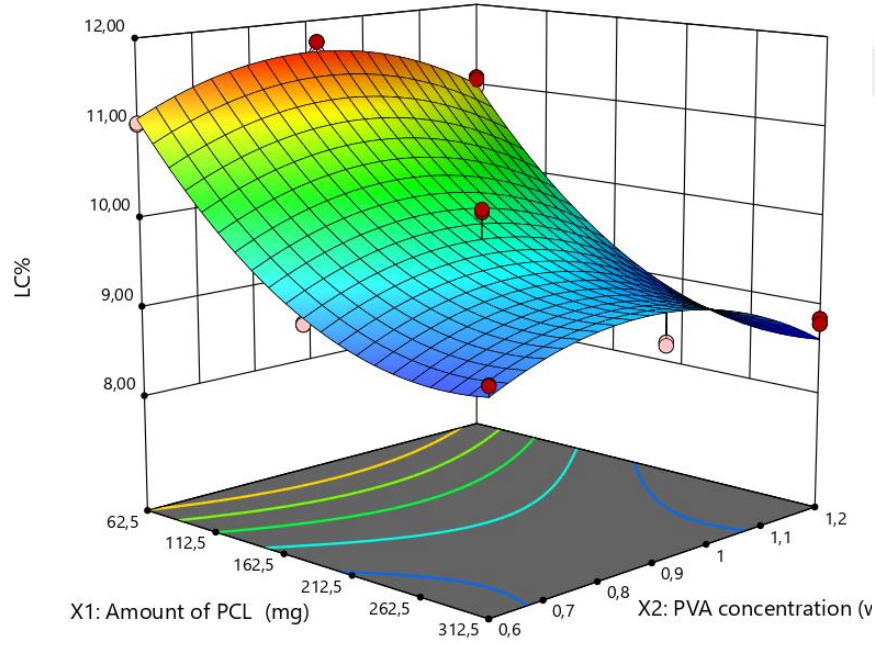


D)

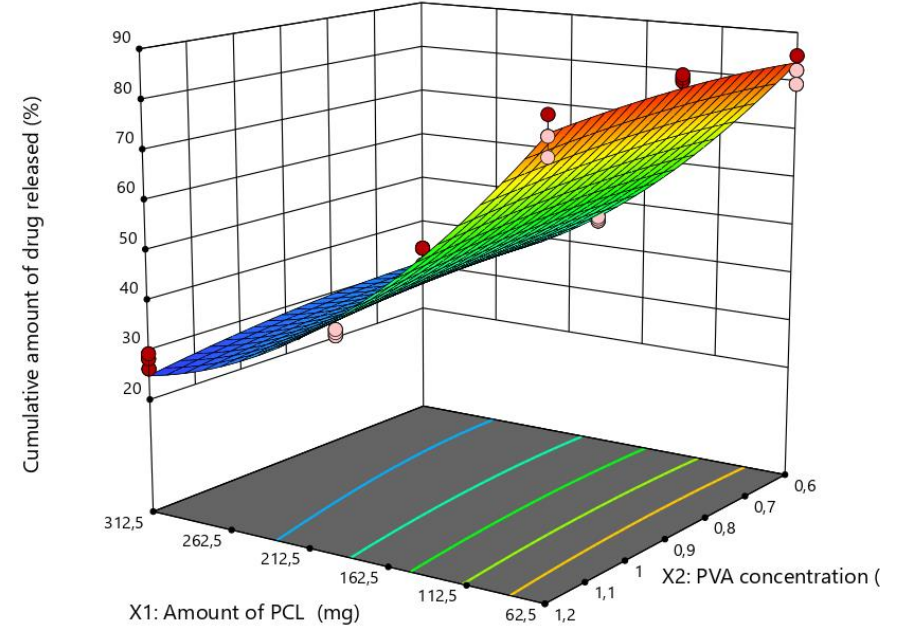


Şekil 3.32. Devam. X_1 (PCL Miktarı) ve X_2 (PVA Konsantrasyonu) değişkenlerinin CCD tasarımıyla elde edilen RSM grafikleri; (A) Y_1 (%Enkapsülasyon etkinliği), (B) Y_2 (Partikül büyüklüğü), (C) Y_3 (PDI), (D) Y_4 (Zeta potansiyel), (E) Y_5 (%Etkin madde yükleme kapasitesi), (F) Y_6 (%AÇEM 48.sa)

E)



F)

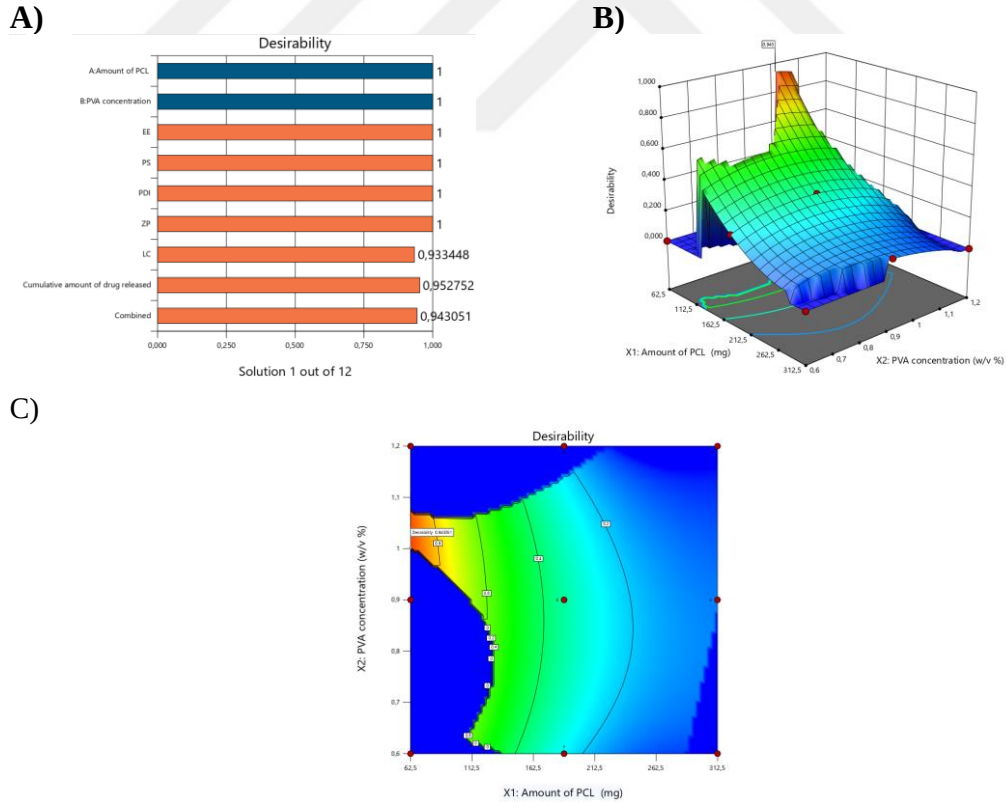


Şekil 3.32. Devam. X_1 (PCL Miktarı) ve X_2 (PVA Konsantrasyonu) değişkenlerinin CCD tasarımıyla elde edilen RSM grafikleri; (A) Y_1 (%Enkapsülasyon etkinliği), (B) Y_2 (Partikül büyüklüğü), (C) Y_3 (PDI), (D) Y_4 (Zeta potansiyel), (E) Y_5 (%Etkin madde yükleme kapasitesi), (F) Y_6 (%AÇEM 48.sa)

Çizelge 2.9.'da verilen nanopartikül optimizasyonu için hedeflen yanıtlar doğrultusunda, her faktörün ve yanıtın hedef limitleri uygulandıktan sonra Çizelge 2.10.'da verilen optimize edilmiş parametreler ile hazırlanan optimum nanopartikül formülasyonunun tahmin edilen ve gözlemlenen yanıt değerleri Çizelge 3.18. ve Şekil 3.33.'te gösterilmiştir. 62,5 mg PCL ve %1,00 a/h PVA konsantrasyonu ile en uygun deneysel parametreleri önermiş ve bunu optimal formülasyon olarak tanımlanmıştır.

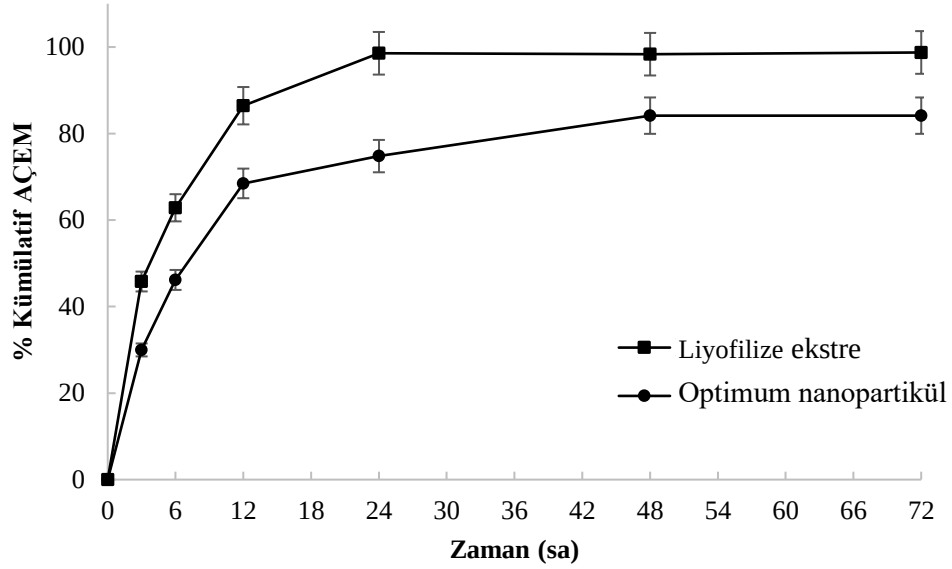
Çizelge 3.18. Optimize edilmiş parametreler ile tahmin edilen ve gözlemlenen yanıt değerleri

	X ₁ (PCL Miktarı)	X ₂ (PVA Konsantras yonu)	Y ₁ (%EE)	Y ₂ (PB)	Y ₃ (PDI)	Y ₄ (ZP)	Y ₅ (%LC)	Y ₆ (%AÇEM 48.sa)
Tahmin edilen değerler	62,5	1,0	90,49	200,00	0,163	-11,28	11,55	84,01
Gözlenen değerler	62,5	1,0	90,70	200,40	0,160	-10,60	11,86	84,14



Şekil 3.33. Optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül formülasyonunun istenirlik eğrisi. (A) Bar istenirlik grafiği, (B) 3B-istenirlik grafiği ve (C) Kontur-istenirlik grafiği.

Optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül formülasyonuna ait %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı grafiği Şekil 3.34.'te verilmiştir.



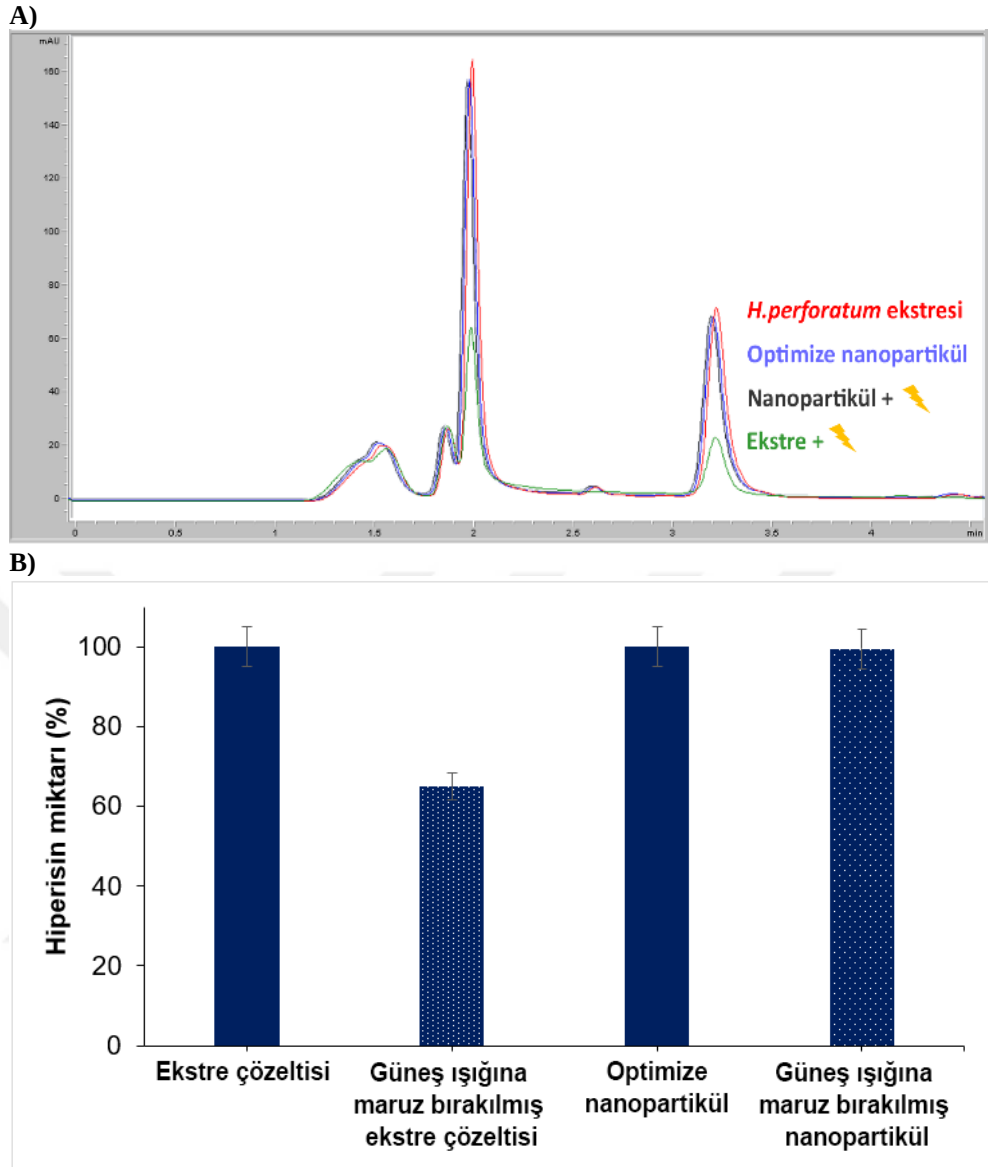
Şekil 3.34. Optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül formülasyonundan ve liyofilize *H.perforatum* ekstrelerinden %kümülatif açığa çıkan hiperisin miktarı ($n=3$)

Optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül formülasyonuna ait *in vitro* çözünme hızı kinetik bulguları Çizelge 3.19.'da verilmiştir.

Çizelge 3.19. Optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül formülasyonuna ait *in vitro* salım kinetik verileri

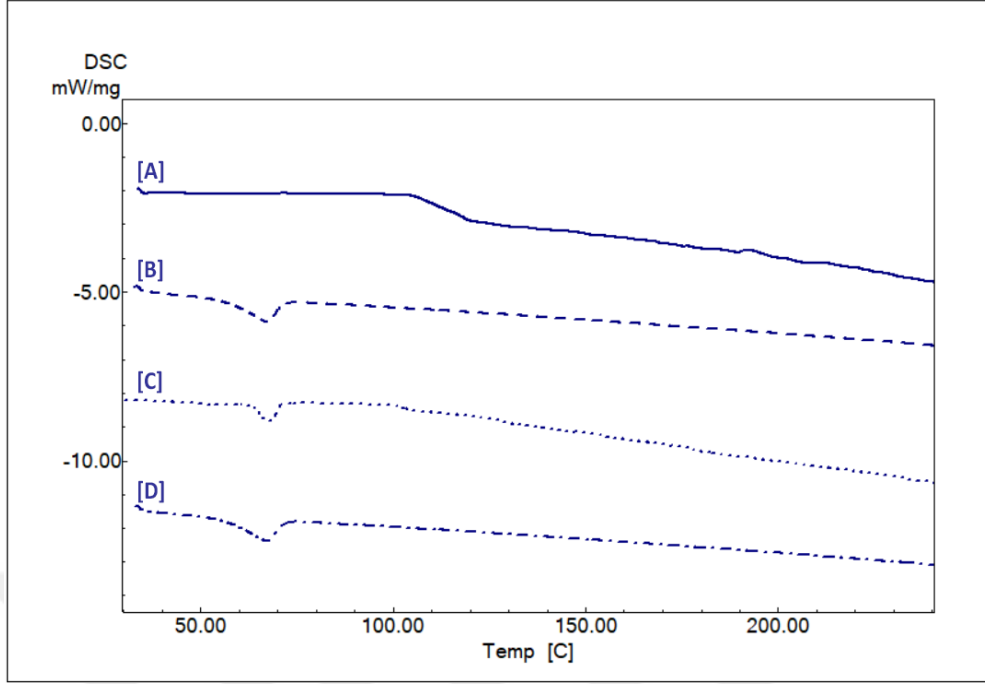
Kinetik Modelleri	Parametreler	Optimize edilmiş nanopartikül	Liyofilize ekstre
Sıfır Derece	k0	2,2880	2,8143
	R ²	-1,2019	-2,9525
	R ² (adjusted)	-1,2019	-2,9525
	AIC	43,8582	47,2925
	MSC	-1,1893	-1,7743
Birinci Derece	k1	0,0685	0,1882
	R ²	0,6831	0,9802
	R ² (adjusted)	0,6831	0,9802
	AIC	34,1660	20,7994
	MSC	0,7491	3,5243
Higuchi	kH	14,5319	18,2447
	R ²	0,6180	0,1066
	R ² (adjusted)	-1,2019	-2,9525
	AIC	35,0996	39,8572
	MSC	0,5624	-0,2873
Korsmeyer-Peppas	kKP	22,8365	37,0119
	R ²	0,8630	0,8265
	R ² (adjusted)	0,8174	0,7686
	AIC	31,9715	33,6641
	MSC	1,1880	0,9513
	n	0,3674	0,2855
Hixson-Crowell	kHC	0,0177	0,0303
	R ²	0,4329	0,5309
	R ² (adjusted)	-1,2019	-2,9525
	AIC	37,0753	36,6361
	MSC	0,1673	0,3569
Weibull	R ²	0,9698	0,9830
	R ² (adjusted)	0,9396	0,9660
	AIC	26,4110	24,0431
	MSC	2,3001	2,8755
	α	3,5290	2,4417
	β	0,5099	0,6524

Optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül formülasyonuna ait ışık stabilitesi bulguları Şekil 3.35.'te verilmiştir.



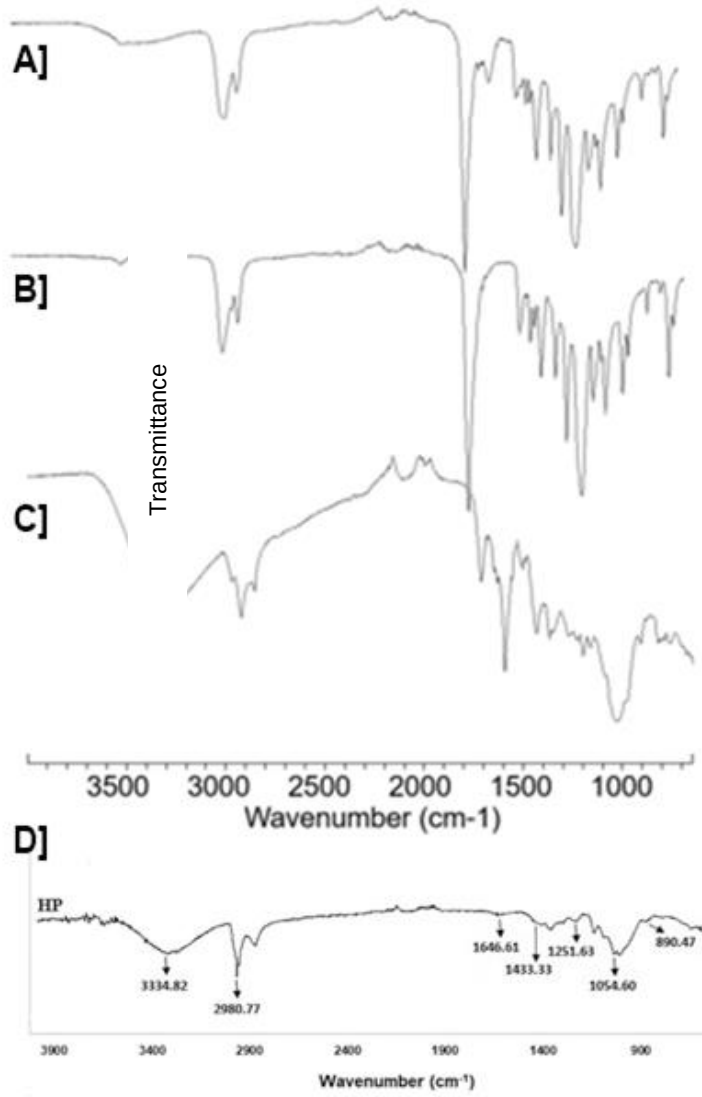
Şekil 3.35. Liyofilize *H.perforatum* ekstresi ve optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikülün ışık maruziyeti öncesi ve 7 gün boyunca güneş ışığı ile maruziyetinden sonra HPLC ile elde edilen hiperisine ait kromatogramlar (A) ve hiperisin yüzdesi grafiği (B)

Liyofilize *H.perforatum* ekstresi, PCL, liyofilize ekstre ile polimerin fiziksel karışımı ve liyofilize optimum *H.perforatum* ekstresi yüklü nanopartiküle ait DSC termogramları Şekil 3.36.'da verilmiştir.



Şekil 3.36. Nanopartikül formülasyonuna ait DSC termogramları; A) liyofilize *H.perforatum* ekstresi, B) PCL polimeri, C) Fiziksel karışım ve D) Optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül

Optimize edilmiş liyofilize *H.perforatum* yüklü nanopartikül, boş PCL nanopartikül ve liyofilize *H.perforatum* ekstresine ait FTIR spektrumları Şekil 3.37.'de verilmiştir.



Şekil 3.37. Nanopartikül formülasyonuna ait FTIR spektrumları; A) Optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül, B) Boş PCL nanopartikül, C) liyofilize *H.perforatum* ekstresi ve D) *H.perforatum* ekstresine ait literatürdeki FTIR spektrumu (Mouro vd., 2021)

3.7. Film Formülasyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

3.7.1. Çözücü Dökme Yöntemi ile Hazırlanan Borik Asit Yüklü Film Formülasyonlarının Geliştirilmesine Ait Bulgular

3.7.1.1. Çözücü Dökme Yöntemi ile Hazırlanan Borik Asit Yüklü Filmlerde Kalınlık ve Viskozite Tayinine Ait Bulgular

Önformülasyon çalışmalarına ait bulgular Çizelge 3.20.'de verilmiştir.

Çizelge 3.20. Önformülasyon çalışmalarına ait bulgular (n=3)

F	Kalınlık (µm) ± SS	Viskozite (Pa.s) ± SS	Film Oluşumu
ÖF1	81,67 ± 9,83	***	++
ÖF2	**	***	-
ÖF3	170,00 ± 17,32	***	++
ÖF4	**	***	-
ÖF5	76,67 ± 8,16	***	++
ÖF6	**	***	-
ÖF7	147,00 ± 26,36	***	++
ÖF8	**	***	-
ÖF9	161,67 ± 6,83	9,98 ± 0,03	++
ÖF10	151,67 ± 15,4	9,93 ± 0,40	++
ÖF11	326,67 ± 36,0	10,53 ± 0,06	++
ÖF12	**	28,10 ± 0,10	++
ÖF13	478,33 ± 10,3	13,20 ± 0,10	++
ÖF14	**	37,10 ± 0,10	++
ÖF15	142,50 ± 5,24	1,20 ± 0,00	++
ÖF16	128,33 ± 15,71	1,10 ± 0,00	++
ÖF17	170,00 ± 25,30	1,00 ± 0,00	++
ÖF18	145,00 ± 18,71	1,37 ± 0,06	++
ÖF19	****	3,63 ± 0,07	++
ÖF20	****	11,27 ± 0,15	++
ÖF21	****	26,67 ± 0,21	++

** Film oluşmadığı için kalınlık ölçümü yapılamamıştır;

*** ÖF1-ÖF8 formülasyonları için viskozite ölçümü yapılmamıştır;

**** ÖF19-ÖF21 formülasyonları için çözücü dökme yöntemi kullanılmadığı için kalınlık ölçümü yapılmamıştır.

++Film oluşumu elde edildi; --Film oluşmadı

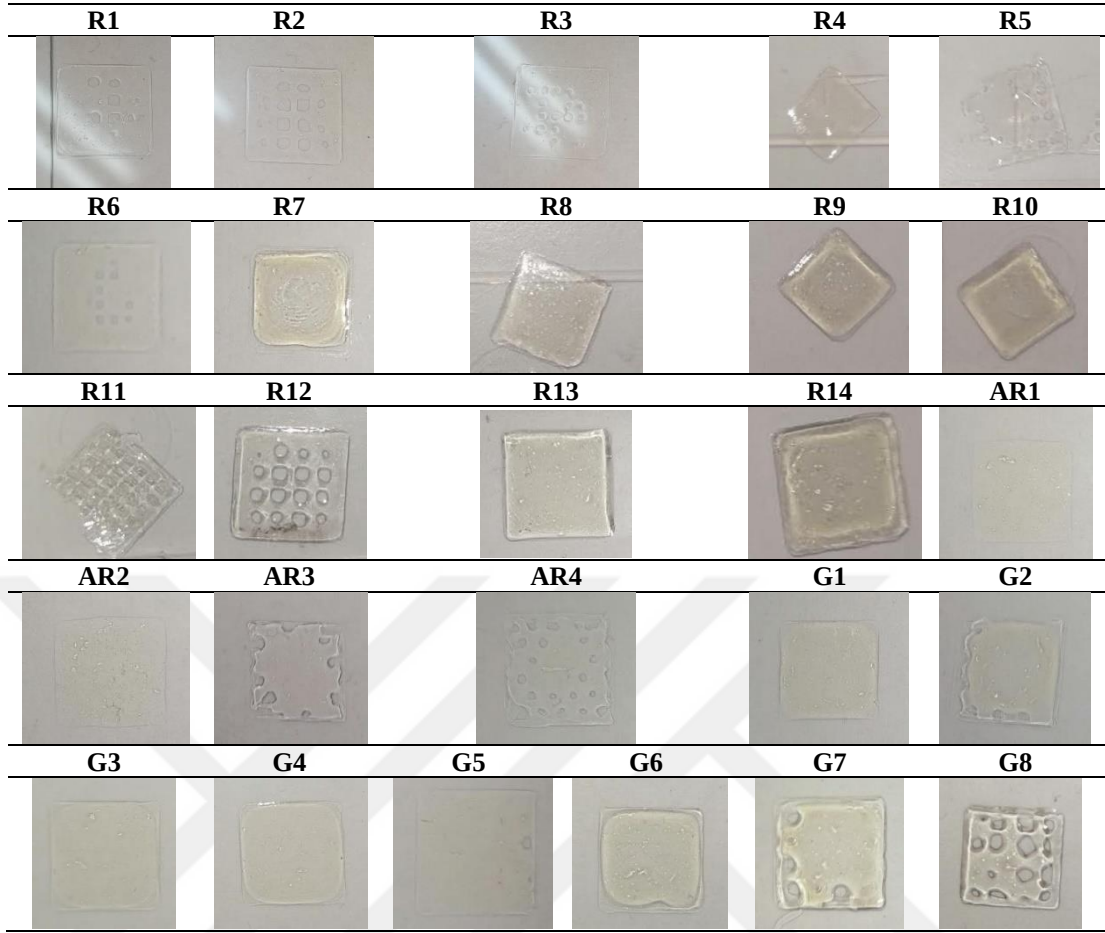
3.7.2. 3B Baskı ile Hazırlanan Borik Asit Yüklü Film Formülasyonlarının Baskı Parametrelerine Belirlenmesi İçin Yapılan Ön Çalışmalara Ait Bulguları

3B baskı ile film hazırlanması sırasında baskı parametrelerinin belirlenmesi için yapılan ön çalışmalara ait bulgular ve görseller Çizelge 3.21. ve Şekil 3.38.'de verilmiştir.

Çizelge 3.21. Değişen polimer oranlı kitozan jeller ile farklı cihaz parametreleri denenerek yapılan baskı ön çalışmalarına ait bulgular

F	KOD*	% Doluluk oranı	Katman yüksekliği (mm)	Nozül baskı hızı (mm/s)	Baskı basıncı (psi)	Basılabilen katman sayısı	Kalınlık (µm)
ÖF20	R1	20	0,1	7	1,8	5	30
	R2	30	0,1	7	1,8	2	20
	R3	40	0,1	7	1,8	2	25
	R4	30	0,15	7	1,8	10	30
	R5	30	0,1	5	1,8	8	40
	R6	30	0,15	9	1,8	3	20
	R7	30	0,1	8	3	7	100
ÖF21	R8	30	0,1	7	10	10	70
	R9	30	0,1	9	10	11	95
	R10	30	0,2	9	10	10	95
	R11	30	0,15	9	10	5	70
	R12	20	0,15	9	10	4	40
	R13	40	0,15	9	10	7	120
	R14	30	0,2	9	10	6	115
ÖF20	AR1	30	0,1	7	2,5	4	35
	AR2	30	0,15	7	2,5	3	25
	AR3	70	0,1	8	1,8	5	35
	AR4	80	0,1	8	1,8	4	30
ÖF20	G1	80	0,1	8	2,5	5	40
	G2	70	0,1	8	2,5	5	60
	G3	60	0,15	8	2,0	10	50
	G4	50	0,15	8	2,0	5	35
	G5	40	0,15	8	2,0	8	40
	G6	40	0,15	8	3,0	8	60
ÖF21	G7	40	0,15	9	9,6	10	95
	G8	30	0,15	9	9,6	5	70

*R: Rectilinear; AR: Aligned Rectilinear; G: Grid desen



Şekil 3.38. Farklı dolgu desenlerinde 3B baskısı alınan film örneklerinin görselleri

3.7.3. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Film Formülasyonlarının Hazırlanmasına Ait Bulgular

3.7.3.1. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Filmlerde Kalınlık, Viskozite ve Etkin Madde Yükleme Etkinliği Tayinine Ait Bulgular

3B baskı ile hazırlanmış borik asit yüklü filmlerde kalınlık, etkin madde yükleme etkinliği ve baskı öncesi jellerde viskozite tayini sonuçları Çizelge 3.22.'de verilmiştir.

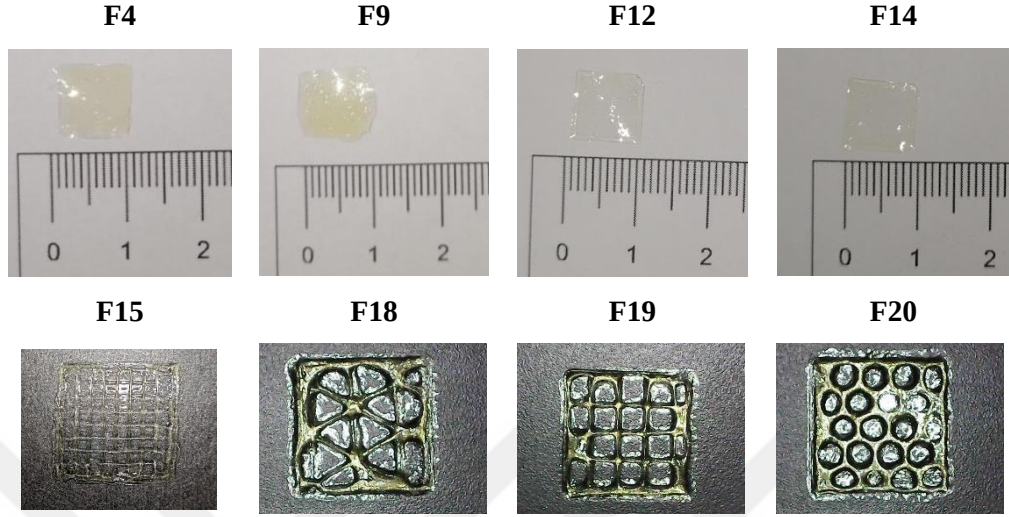
Çizelge 3.22. 3B baskı ile borik asit yüklü filmlerde baskı öncesi jellerde viskozite, filmler için kalınlık ve etkin madde yükleme etkinliği sonuçları (n=3)

F	Viskozite (Pa.s) ± SS	Kalınlık (µm) ± SS	Yükleme etkinliği (%) ± SS
F1	35,70 ± 0,17	81,67 ± 8,76	**
F2	35,33 ± 0,15	82,50 ± 6,12	**
F3	26,67 ± 0,21	85,83 ± 3,76	90,83 ± 2,74
F4	29,57 ± 0,45	103,3 ± 5,16	84,05 ± 5,54
F5	31,53 ± 0,15	117,5 ± 4,18	84,10 ± 15,0
F6	36,53 ± 0,25	111,7 ± 6,83	83,88 ± 5,25
F7	27,83 ± 0,15	134,2 ± 28,5	87,47 ± 2,63
F8	27,90 ± 0,26	126,7 ± 14,7	94,87 ± 2,45
F9	28,57 ± 0,31	142,5 ± 11,7	97,45 ± 1,95
F10	39,83 ± 0,42	*	**
F11	23,03 ± 0,38	60,00 ± 8,94	**
F12	26,67 ± 0,21	55,83 ± 8,01	91,88 ± 0,15
F13	27,90 ± 0,26	70,83 ± 2,04	79,37 ± 10,73
F14	28,57 ± 0,31	70,83 ± 3,76	79,94 ± 18,27
F15	26,67 ± 0,21	130,0 ± 17,6	92,02 ± 1,21
F16	26,67 ± 0,21	255,0 ± 8,37	94,24 ± 1,18
F17	26,67 ± 0,21	*	**
F18	26,67 ± 0,21	206,67 ± 19,66	87,99 ± 4,35
F19	26,67 ± 0,21	310,00 ± 12,25	91,75 ± 8,61
F20	26,67 ± 0,21	293,33 ± 8,16	86,19 ± 1,06

*F10 ve F17 formülasyonları basılamadığı için kalınlık ölçümü yapılamamıştır.

**F1-F2-F10-F11-F17 formülasyonlarında işlem etkinliği tayini yapılamamıştır.

Bölüm 3.7.2.'de verilen önformülasyon bulgularına dayalı olarak seçilen farklı desenlerde hazırlanmış bazı film formülasyonlarının görselleri Şekil 3.39.'da verilmiştir.



Şekil 3.39. Film formülasyonlarının görselleri (F4-F14 (Rectilinear-konik tip) , F15 (Rectilinear-Blunt tip), F18 (Triangles), F19 (Grid), F20 (Honeycomb))

3.7.3.2. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Filmlerde Gerilme Direnci ve Adezyon Testlerine Ait Bulgular

3B baskı ile hazırlanmış borik asit yüklü filmlerde gerilme direnci ve adezyon testlerine ait bulgular Çizelge 3.23.'te verilmiştir.

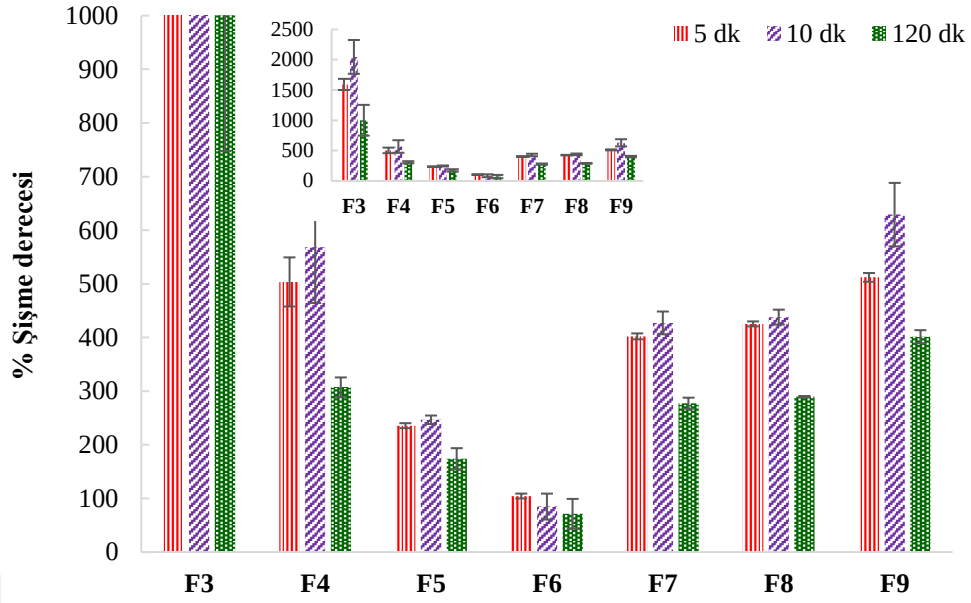
Çizelge 3.23. 3B Baskı ile borik asit yüklü filmlerde filmlerde gerilme direnci ve adezyon sonuçları (n=3)

F	Gerilme Direnci (MPa) ± SS	Adezyon kuvveti (N) ± SS
F1	29,85 ± 2,58	2,382 ± 0,19
F2	32,51 ± 2,93	2,720 ± 0,13
F3	31,99 ± 9,09	2,796 ± 0,04
F4	14,75 ± 11,7	2,092 ± 0,46
F5	7,862 ± 1,58	1,559 ± 0,92
F6	0,830 ± 0,20	0,478 ± 0,06
F7	18,29 ± 4,61	2,711 ± 0,12
F8	17,32 ± 5,09	2,559 ± 0,32
F9	8,140 ± 1,78	2,591 ± 0,17
F10	*	*
F11	7,725 ± 2,26	0,486 ± 0,01
F12	15,300 ± 5,22	1,181 ± 0,10
F13	21,416 ± 3,92	2,034 ± 0,20
F14	14,860 ± 3,35	1,914 ± 0,76
F15	6,240 ± 1,26	0,373 ± 0,10
F16	8,860 ± 2,39	0,701 ± 0,30
F17	*	*
F18	3,997 ± 1,52	0,305 ± 0,06
F19	5,017 ± 1,18	0,771 ± 0,21
F20	7,542 ± 3,86	0,560 ± 0,11

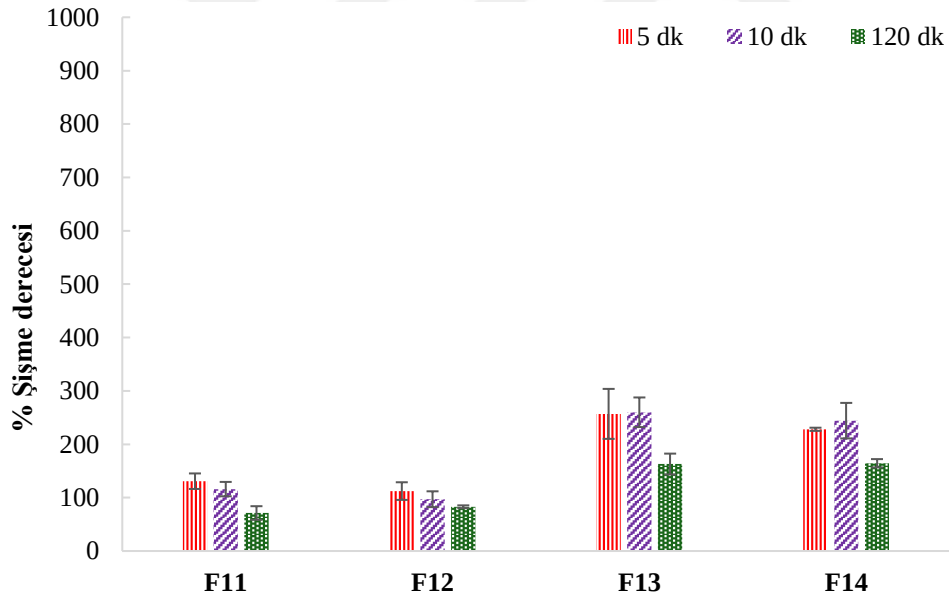
*F10 ve F17 formülasyonları basılamadığı için ölçüm yapılamamıştır.

3.7.3.3. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Filmlerde Şişme Derecelerine Ait Bulgular

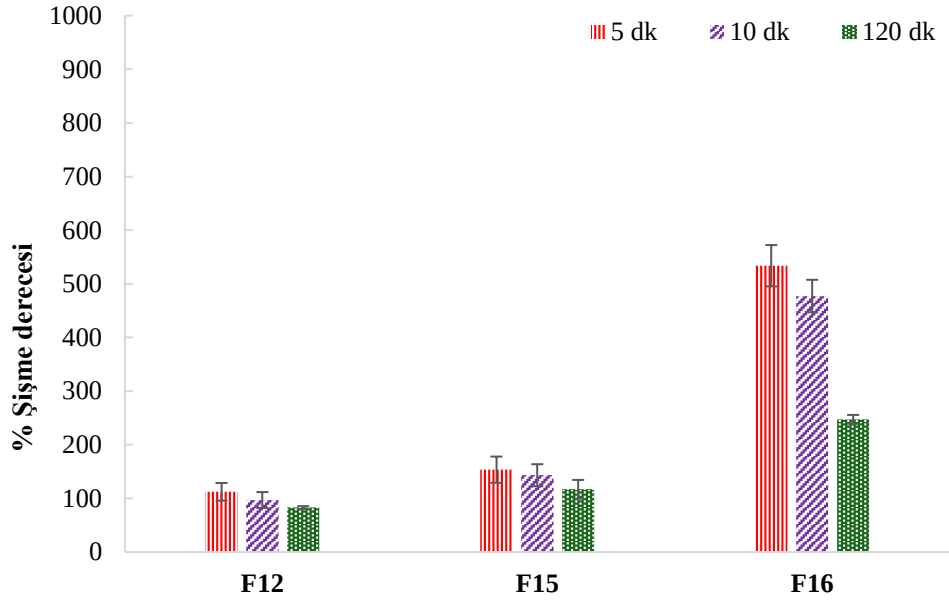
3B baskı ile hazırlanmış borik asit yüklü filmlerde şişme derecelerine ait bulgular Şekil 3.40.-3.43.'te verilmiştir. Şekil 3.40.'ta F3 formülasyonunun şişme derecesi diğerlerinden çok yüksek olduğu için şekil içi grafikte ayrıca gösterilmiştir.



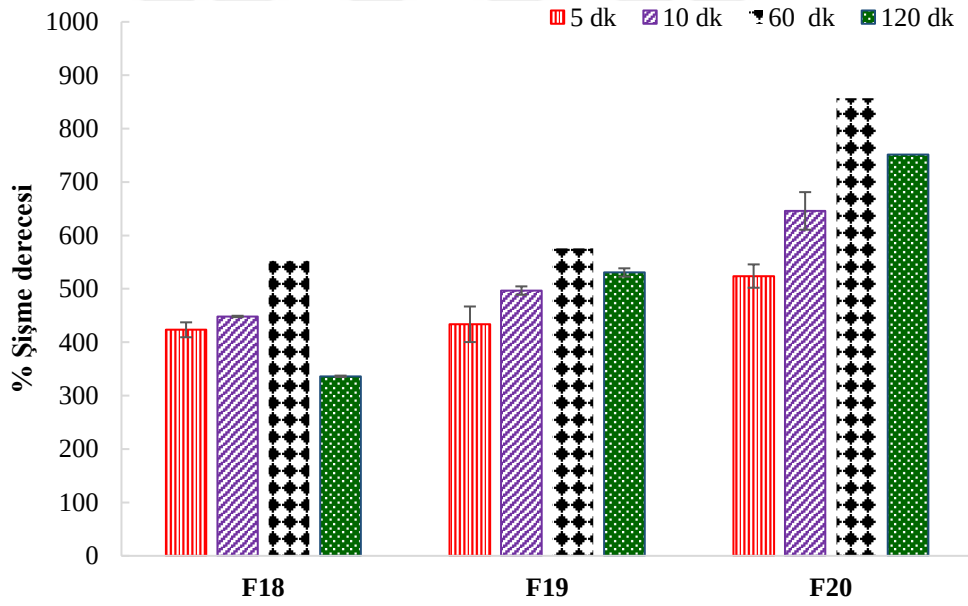
Şekil 3.40. Farklı plastizer oranı (F3-F6) ve etkin madde miktarı (F6-F9) kullanılarak konik tip baskı ucu ile 3B basılan film formülasyonlarına ait şişme derecesi sonuçları (n=3)



Şekil 3.41. Etkin madde oranları değiştirilerek 25 Gauge blunt tip baskı ucu ile 3B basılan film formülasyonlarına ait şişme derecesi sonuçları (n=3)



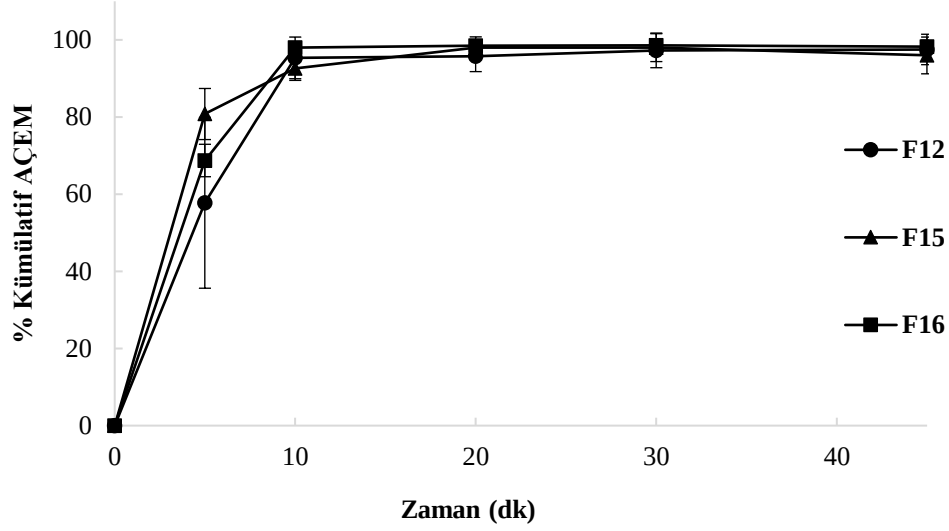
Şekil 3.42. Ek kurutma ve katman sayısı değiştirilerek 3B hazırlanan film formülasyonlarına ait şişme derecesi sonuçları($n=3$)



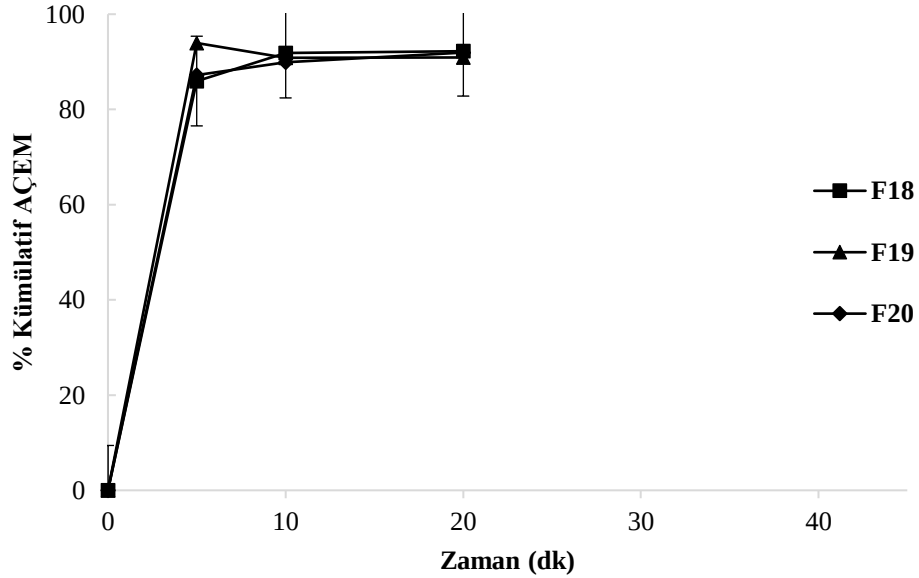
Şekil 3.43. Aynı içerikte farklı desenlerde (F18 triangles; F19 Grid; F20 honeycomb) 3B basılan film formülasyonlarına ait şişme derecesi sonuçları ($n=3$)

3.7.3.4. 3B Baskı ile Borik Asit Yüklü Filmlerde *In Vitro* Etkin Madde Salımına Ait Bulgular

3B baskı ile hazırlanan borik asit yüklü filmlerde *in vitro* etkin madde salımı yapılan formüllere ait bulgular Şekil 3.44. ve 3.45.'te verilmiştir.



Şekil 3.44. Ek kurutma olmadan (F12), ek kurutma ve katman sayısı (F15-16) değiştirilerek hazırlanan film formülasyonlarında (Çizelge 2.18.) borik asitin *in vitro* salım profili ($n=3$)



Şekil 3.45. Aynı içerikte farklı desenlerde (F18 triangles; F19 Grid; F20 honeycomb) 3B basılan film formülasyonlarında (Çizelge 2.19.) borik asitin *in vitro* salım profili ($n=3$)

3.7.4. Optimum Film Formülasyonunun DoE ile Belirlenmesine Ait Bulgular

Bölüm 2.2.9.4.'te açıklandığı şekilde Design-Expert yazılımı (sürüm 13.0.5.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak üç seviye ve üç tekrarla toplam yirmi yedi 3B film çalışmasına ait DoE verileri Çizelge 3.24.'te gösterilmektedir. Değişkenler arasındaki ilişkileri daha detaylı incelemek amacıyla yapılan çoklu regresyon analizi sonuçları Çizelge 3.25.'de özetlenmiştir. Buna ek olarak, bağımsız faktörler arasındaki etkileşimleri ve bunların yanıtlar üzerindeki etkilerini tespit etmek amacıyla CCD tasarım kullanılarak oluşturulan 3B RSM grafikleri Şekil 3.46.'da gösterilmiştir.



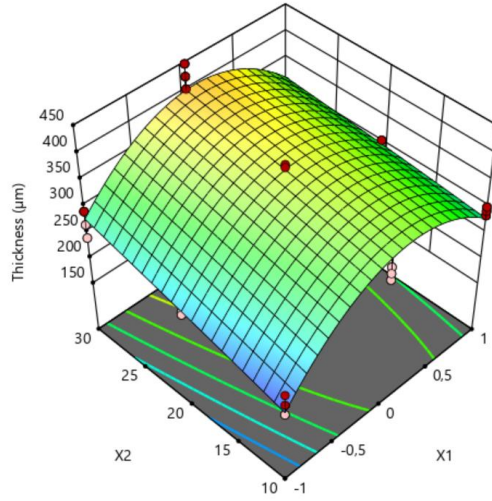
Çizelge 3.24. CCD metoduyla elde edilen borik asit yüklü 3B basılmış filmlere ait DoE verileri

No	X ₁ (Desen)	X ₂ (Borik asit miktarı)	Y ₁ (Kalınlık)	Y ₂ (%Yükleme Etkinliği)	Y ₃ (Adezyon kuvveti)	Y ₄ (Mekanik direnç)	Y ₅ (Elastikiyet)	Y ₆ (Young's modül)	Y ₇ (Şişme Derecesi 15.dk)	Y ₈ (%AÇEM 15.dk)
1	Triangular	10	206,67	93,01	0,37	2,30	3,49	0,71	450,31	73,20
2	Triangular	10	187,01	85,48	0,31	5,22	3,09	0,85	433,33	77,16
3	Triangular	10	226,33	85,48	0,24	4,47	3,79	0,88	461,29	72,38
4	Triangular	20	232,50	83,09	0,33	5,17	3,69	0,83	649,44	79,41
5	Triangular	20	229,76	89,30	0,53	5,97	3,69	0,89	741,84	79,49
6	Triangular	20	235,24	92,12	0,47	5,76	3,69	0,87	798,06	82,14
7	Triangular	30	266,67	101,50	0,52	7,55	6,99	0,96	566,67	66,18
8	Triangular	30	240,85	93,79	0,88	8,12	4,29	1,04	637,71	66,85
9	Triangular	30	292,49	93,79	0,54	7,19	2,09	0,83	587,60	68,92
10	Grid	10	310,00	101,69	0,75	6,24	3,37	0,98	489,21	37,08
11	Grid	10	297,75	86,78	0,57	4,92	2,99	0,85	488,60	46,69
12	Grid	10	322,25	86,78	0,99	3,88	1,79	1,17	512,66	39,16
13	Grid	20	375,00	84,71	0,77	7,58	3,29	1,19	761,70	39,94
14	Grid	20	369,52	85,44	0,86	7,01	3,09	1,14	762,24	41,06
15	Grid	20	380,48	90,04	0,75	7,35	3,39	1,18	779,61	39,83
16	Grid	30	423,33	90,97	0,50	10,92	5,59	1,57	734,02	38,94
17	Grid	30	400,82	88,10	0,71	10,86	6,69	0,99	733,43	40,82
18	Grid	30	445,84	88,10	1,21	9,95	4,49	1,56	803,94	37,70
19	Honeycomb	10	293,33	84,96	0,50	3,76	1,79	0,89	654,27	55,14
20	Honeycomb	10	285,17	86,80	0,49	7,38	2,79	1,13	631,46	51,12
21	Honeycomb	10	301,49	86,80	0,69	11,48	6,79	1,55	652,03	49,06
22	Honeycomb	20	298,33	85,87	1,22	5,95	1,19	1,54	673,36	34,07
23	Honeycomb	20	290,80	89,05	1,24	15,32	6,69	2,94	627,93	35,40
24	Honeycomb	20	305,86	89,08	1,21	6,86	3,49	1,25	650,26	35,75
25	Honeycomb	30	301,67	95,87	1,33	13,51	8,59	1,25	730,20	40,19
26	Honeycomb	30	297,59	98,74	1,31	15,46	7,39	2,30	724,97	38,44
27	Honeycomb	30	305,75	98,74	1,27	15,37	5,99	1,47	724,80	38,27

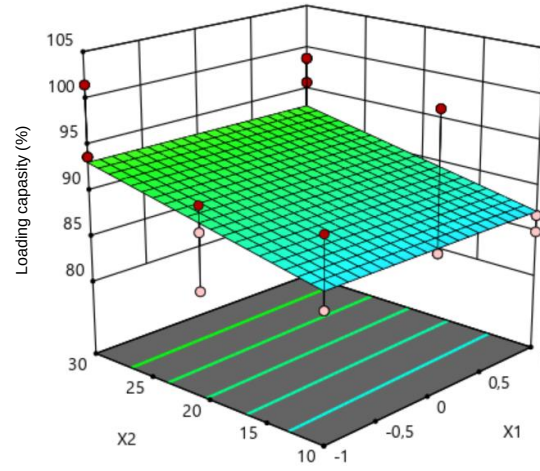
Çizelge 3.25. CCD metoduyla elde edilen borik asit yüklü 3B basılmış filmlerde çoklu regresyon analizi sonuçları

Yanıtlar	Model Eşitliği	p-Value	Adjusted R ²	Predicted R ²	Adequate Precision	Significant Terms	Eşitlik
Y ₁ (Kalınlık)	Quadratic (p<0,0001)	0,0004	0,8850	0,8457	19,9859	X ₁ (p<0,0001) X ₂ (p<0,0001) X ₁ ² (p<0,0001)	303,337 + 57,0783 * X ₁ + 3,69383 * X ₂ - 1,2915 * X ₁ X ₂ - 102,915 * X ₁ ² - 0,01665 * X ₂ ²
Y ₂ (%Yükleme etkinliği)	Linear (p= 0,0639)	0,0479	0,1386	0,0020	3,6267	X ₂ (p=0,0203)	84,47 - 0,091750 * X ₁ + 0,28777 * X ₂
Y ₃ (Adezyon kuvveti)	Linear (p<0,0001)	0,0210	0,6326	0,5674	13,3974	X ₁ (p<0,0001) X ₂ (p=0,0010)	0,388693 + 0,282417 * X ₁ + 0,0186183 * X ₂
Y ₄ (Mekanik direnç)	Linear (p<0,0001)	0,7408	0,6325	0,5871	14,2218	X ₁ (p<0,0001) X ₂ (p<0,0001)	2,51001 + 2,40737 * X ₁ + 0,273678 * X ₂
Y ₅ (Elastikiyet)	Linear (p= 0,0270)	0,7486	0,1982	0,0120	4,1055	X ₂ (p=0,0078)	2,23889 + 4,71616e-16 * X ₁ + 0,0812222 * X ₂
Y ₆ (Young's modül)	Linear (p= 0,0007)	0,7161	0,4109	0,3108	8,4152	X ₁ (p=0,0004)	0,884344 + 0,360111 * X ₁ + 0,0165389 * X ₂
Y ₇ (Şişme Derecesi 15.dk)	Quadratic (p<0,0001)	0,0003	0,7959	0,7320	14,2528	X ₁ (p=0,0025) X ₂ (p<0,0001) X ₁ X ₂ (p=0,0028)	353,557 + 141,35 * X ₁ + 23,656 * X ₂ - 5,00355 * X ₁ X ₂ - 40,8493 * X ₁ ² - 0,327306 * X ₂ ²
Y ₈ (%Kümülatif AÇEM 15.dk)	Quadratic (p<0,0001)	<0,0001	0,9053	0,8754	16,2262	X ₁ (p<0,0001) X ₂ (p=0,0077) X ₁ ² (p<0,0001)	47,8948 - 13,0771 * X ₁ - 0,428031 * X ₂ - 0,146976 * X ₁ X ₂ + 17,8174 * X ₁ ² + 0,00171847 * X ₂ ²

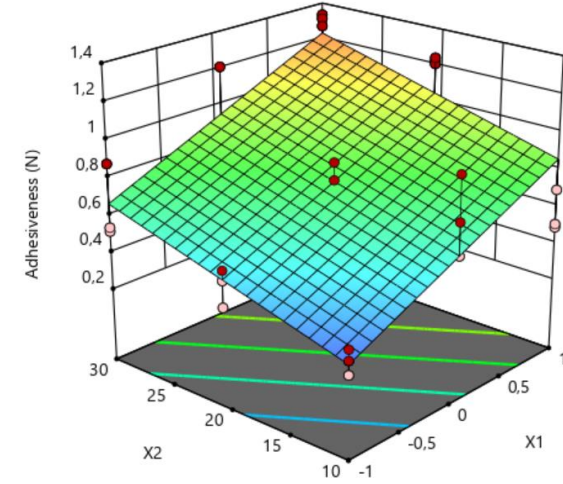
A)



B)

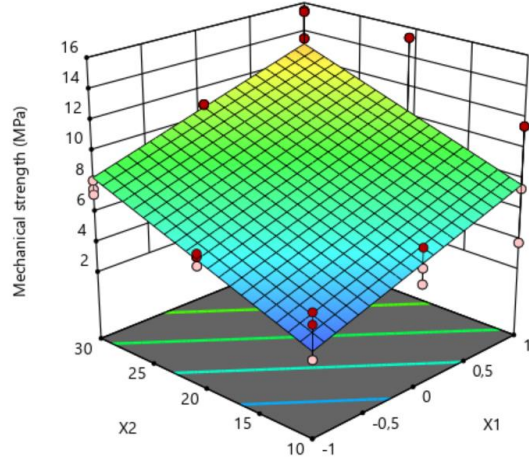


C)

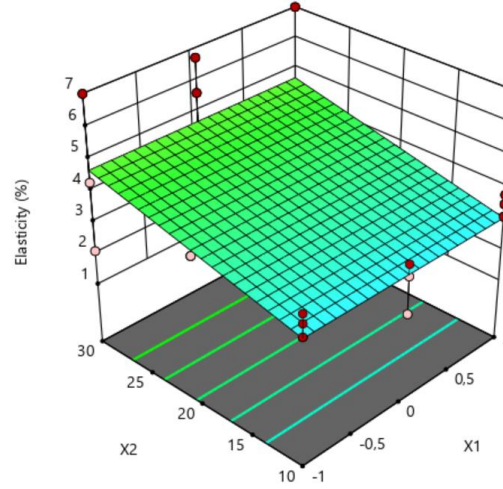


Şekil 3.46. X_1 (Desen) ve X_2 (Borik asit miktarı)'nin RSM grafikleri; (A) Y_1 (Kalınlık), (B) Y_2 (%Yükleme etkinliği), (C) Y_3 (Adezyon kuvveti), (D) Y_4 (Mekanik direnç), (E) Y_5 (Elastikiyet), (F) Y_6 (Young's modül), (G) Y_7 (Şişme Derecesi 15.dk), (H) Y_8 (%Kümülatif AÇEM 15.dk)

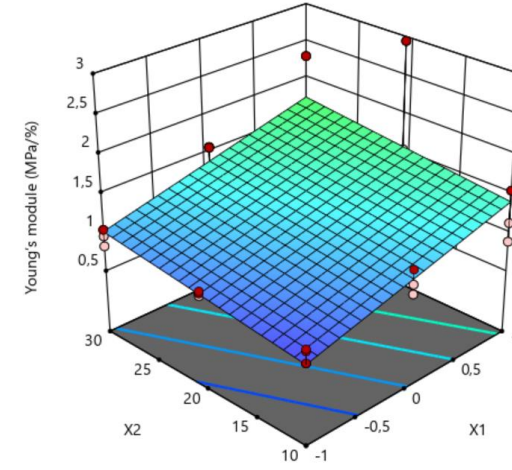
D)



E)

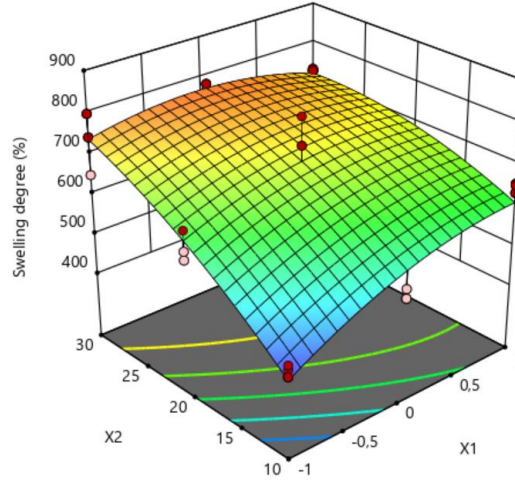


F)

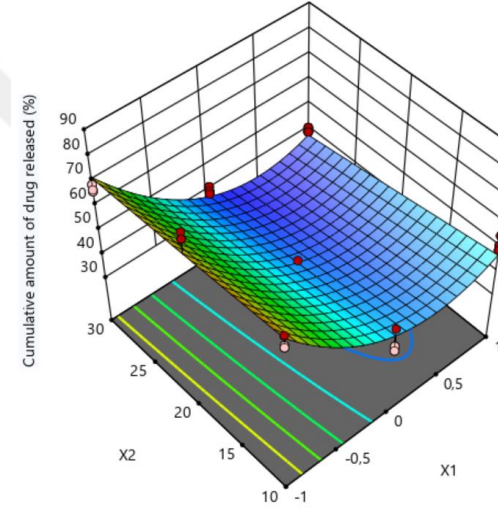


Şekil 3.46. Devam. X_1 (Desen) ve X_2 (Borik asit miktarı)'nin RSM grafikleri; (A) Y_1 (Kalınlık), (B) Y_2 (%Yüklemeye etkinliği), (C) Y_3 (Adezyon kuvveti), (D) Y_4 (Mekanik direnç), (E) Y_5 (Elastikiyet), (F) Y_6 (Young's modül), (G) Y_7 (Şişme Derecesi 15.dk), (H) Y_8 (%Kümülatif AÇEM 15.dk)

G)

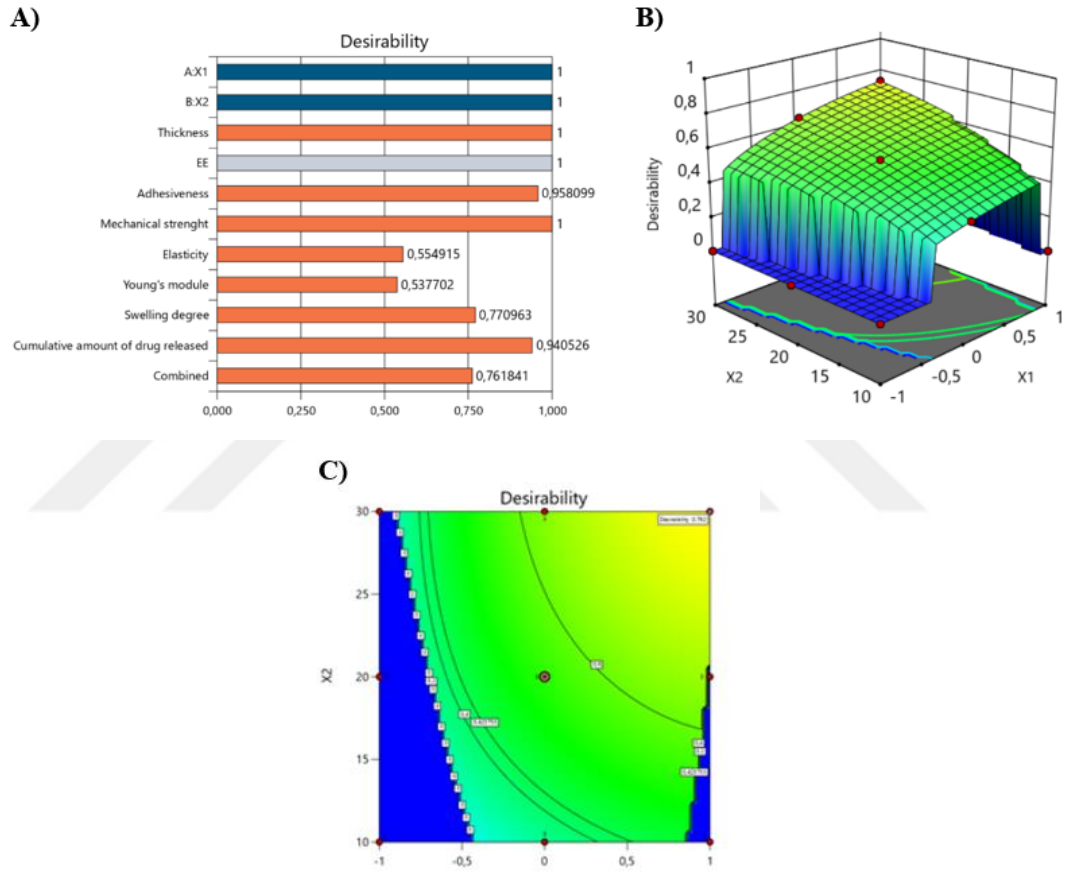


H)



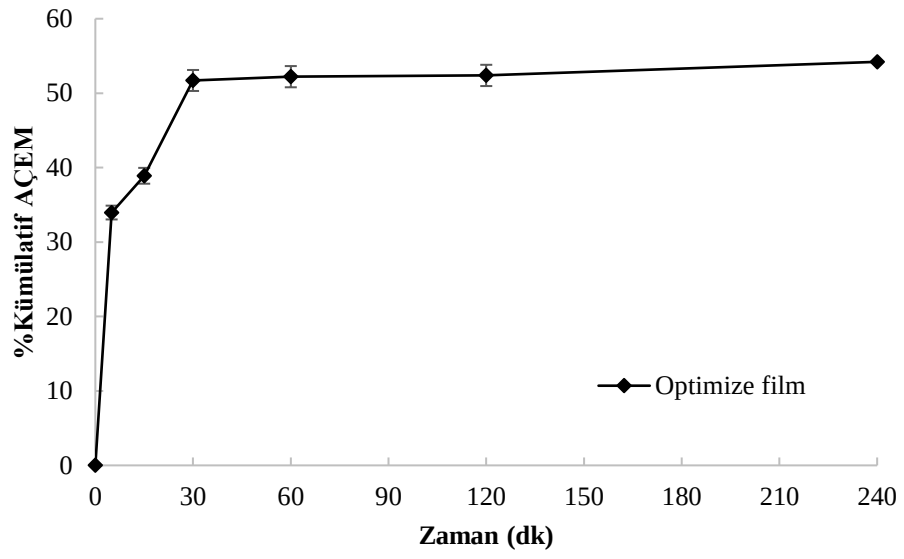
Şekil 3.46. Devam. X_1 (Desen) ve X_2 (Borik asit miktarı)'nin RSM grafikleri; (A) Y_1 (Kalınlık), (B) Y_2 (%Yükleme etkinliği), (C) Y_3 (Adezyon kuvveti), (D) Y_4 (Mekanik direnç), (E) Y_5 (Elastikiyet), (F) Y_6 (Young's modül), (G) Y_7 (Şişme Derecesi 15.dk), (H) Y_8 (%Kümülatif AÇEM 15.dk)

Çizelge 2.22.'de verilen film optimizasyonu için hedeflen yanıtlar doğrultusunda, her faktörün ve yanıtın hedef limitleri uygulandıktan sonra Çizelge 2.23.'te verilen optimize edilen parametrelerle hazırlanan optimum film formülasyonuna ait istenirlik grafiği Şekil 3.47.'de gösterilmiştir. %Yükleme etkinliğinin verilerinin hepsi yüksek ve birbirine yakın olduğundan denklem anlamlı sonuç vermemiştir. Bu nedenle optimizasyona dahil edilmemiştir. CCD tarafından en uygun deneysel parametrelerin 30 mg borik asit ve honeycomb deseni ile elde edileceği önerilmiş ve bu optimal formülasyon olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.47. Optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyonunun istenirlik eğrisi. (A) Bar-istenirlik grafiği, (B) 3B-istenirlik grafiği ve (C) Kontur-istenirlik grafiği.

Optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyonuna ait *in vitro* salım grafiği Şekil 3.48.'te verilmiştir.



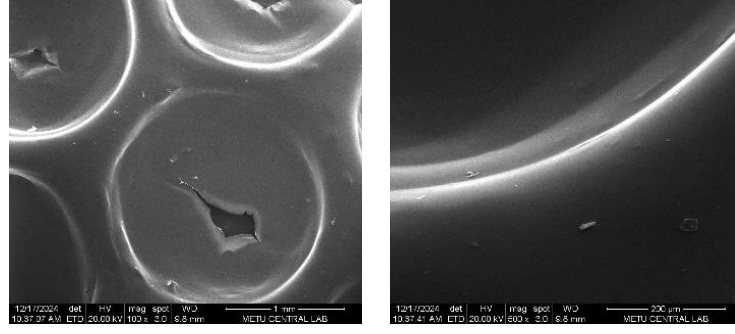
Şekil 3.48. Optimize edilmiş Borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyondan *in vitro* salım grafiği ($n=3$)

Optimize edilmiş Borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyondan *in vitro* salım kinetiği bulguları Çizelge 3.26.'da verilmiştir.

Çizelge 3.26. Optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyondan *in vitro* salım kinetikleri

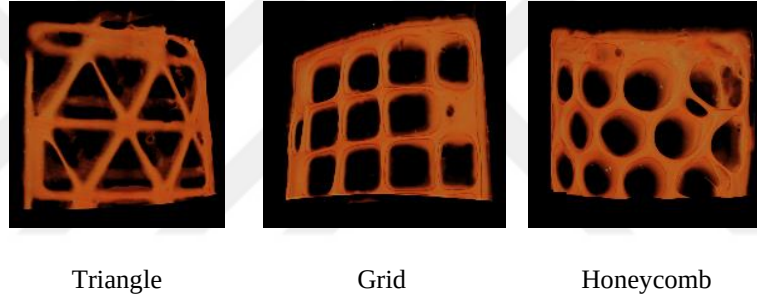
Kinetik Modelleri	Parametreler	Optimum film
Sıfır Derece	k0	0,1203
	R ²	-13,6625
	R ² (adjusted)	-13,6625
	AIC	66,0187
	MSC	-2,9710
Birinci Derece	k1	0,0028
	R ²	-9,3119
	R ² (adjusted)	-9,3119
	AIC	63,5547
	MSC	-2,6190
Higuchi	kH	3,4242
	R ²	-5,3127
	R ² (adjusted)	-5,3127
	AIC	60,1196
	MSC	-2,1283
Korsmeyer-Peppas	kKP	29,6657
	R ²	0,8711
	R ² (adjusted)	0,8453
	AIC	34,8806
	MSC	1,4773
	n	0,1216
Hixson-Crowell	kHC	0,0008
	R ²	-10,3995
	R ² (adjusted)	-10,3995
	AIC	64,2566
	MSC	-2,7193
Weibull	R ²	0,8973
	R ² (adjusted)	0,8459
	AIC	35,2904
	MSC	1,4188
	α	2,7822
	β	0,1600

Optimize edilmiş Borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyonuna ait SEM görüntüleri Şekil 3.49.'da verilmiştir.



Şekil 3.49. Optimize edilmiş Borik asit yüklü film formülasyonuna ait SEM görüntüleri

Çizelge 3.24.'te yer alan CCD metoduyla elde edilen borik asit yüklü 3B basılmış filmlerden birer örnekte mikro-BT ile 3B görüntüleri alınmış (Şekil 3.50.) ve analiz sonuçları Çizelge 3.27.'de gösterilmiştir.

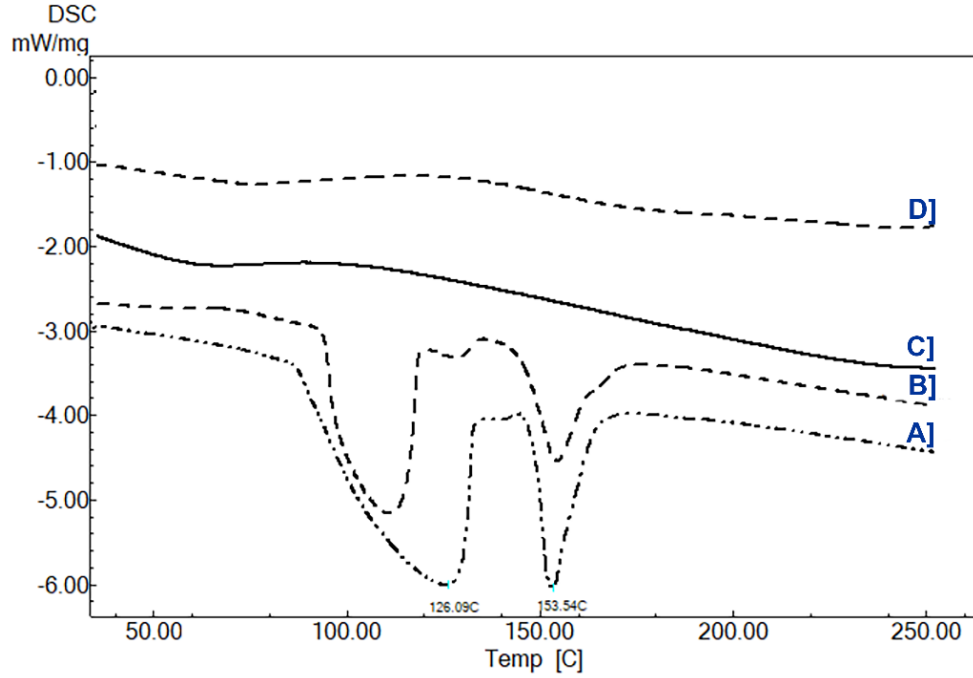


Şekil 3.50. Farklı dolgu desenlerinde 3B basılmış formülasyonlara ait 3B Mikro-BT görüntüleri

Çizelge 3.27. CCD metoduyla elde edilen borik asit yüklü 3B basılmış filmlerden birer örnekte Mikro-BT tarama sonuçları

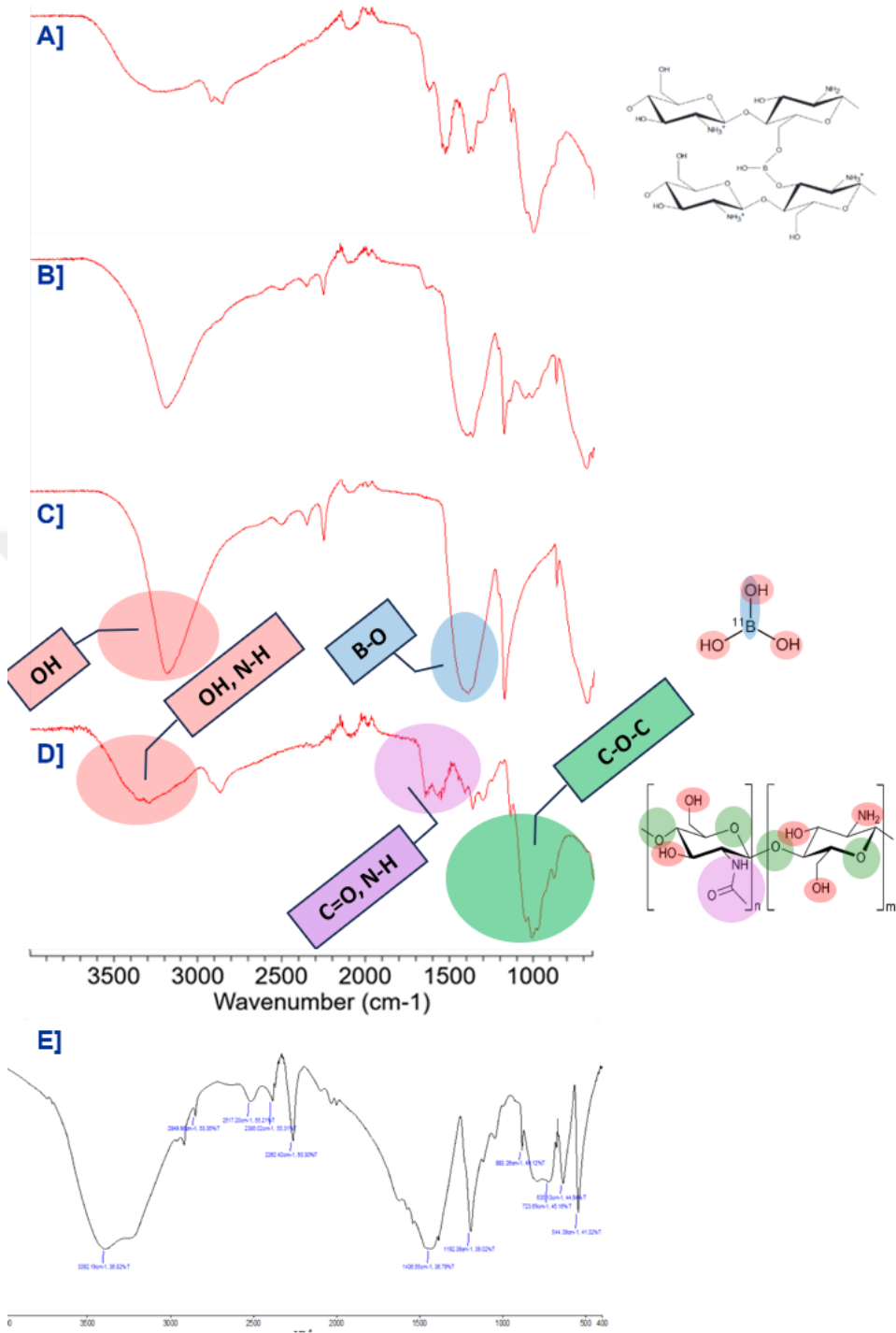
Desen	Triangular			Grid			Honeycomb		
Borik asit miktarı	10 mg	20 mg	30 mg	10 mg	20 mg	30 mg	10 mg	20 mg	30 mg
Toplam hacim (TV) (mm ³)	1394,26	1251,59	1662,73	1387,77	1446,13	1330,70	1509,69	1365,72	1147,83
Numune hacmi (Obj.V)	2,69	5,02	7,79	6,33	5,80	7,47	8,94	5,46	7,24
Nesne hacmi yüzdesi (Obj.V/TV(%))	0,19	0,40	0,47	0,46	0,40	0,56	0,59	0,40	0,63
Kapalı gözenek sayısı	32,00	33,00	26,00	150,00	152,00	125,00	259,00	257,00	260,00
Açık gözenek alanı hacmi (mm ³)	2,69	5,02	7,78	6,33	5,79	7,47	8,94	5,46	7,24
Açık gözeneklilik (%)	99,81	99,60	99,53	99,54	99,60	99,44	99,41	99,60	99,37
Konnektivite	96,00	47,00	67,00	530,00	514,00	585,00	849,00	846,00	874,00
Anizotropi derecesi	1,56	1,90	1,30	1,68	1,72	1,64	1,84	1,80	1,86

Borik asit, kitozan, borik asit ve kitozanın fiziksel karışımı ve liyofilize edilerek kurutulmuş borik asit içeren 3B basılmış filme ait DSC termogramları Şekil 3.51.'de verilmiştir.



Şekil 3.51. Film formülasyonuna ait DSC termogramları; A) Borik asit, B) fiziksel karışım, C) Kitozan ve D) Optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film

Borik asit, kitozan, fiziksel karışım ve optimize edilmiş borik asit içeren 3B basılmış filme ait FTIR spektrumları Şekil 3.52.'de verilmiştir.



Şekil 3.52. Film formülasyonuna ait FTIR spektrumları; A) Optimize edilmiş Borik asit yüklü 3B basılmış film, B) fiziksel karışım, C) Borik asit, D) Kitozan ve E) Borik asite ait literatürdeki FTIR spektrumu (Özdemir ve Keskiner, 2018)

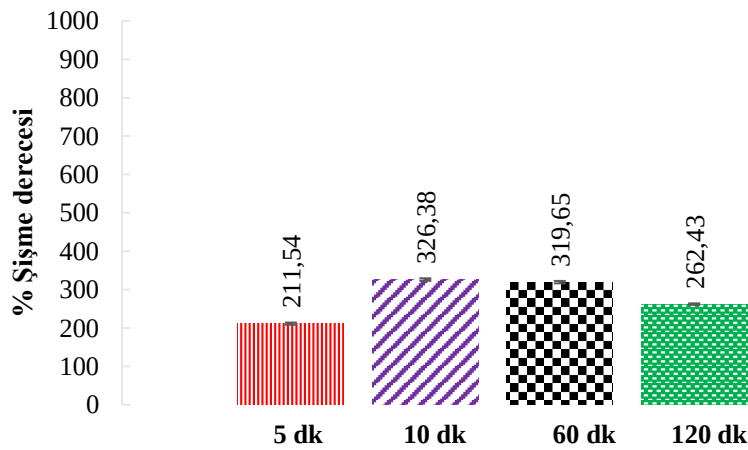
3.8. Nanopartikül Yüklü Yara Örtüsü Formülasyonlarına Ait Bulgular

Yara örtüsü formülasyonuna ait kalınlık, gerilme direnci, elastikiyet, young's modül, adezyon kuvveti, su buharı geçirgenliği ve oksijen geçirgenliği bulguları Çizelge 3.28.'de verilmiştir.

Çizelge 3.28. Yara örtüsüne ait kalınlık, gerilme direnci, elastikiyet, young's modül, adezyon kuvveti, su buharı geçirgenliği ve oksijen geçirgenliği sonuçları (n=3)

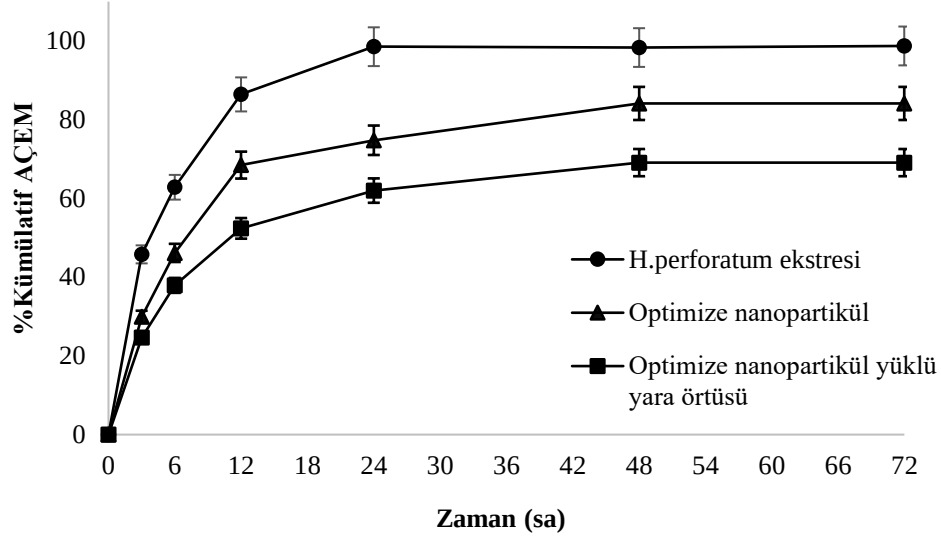
Formülasyon	Yara Örtüsü
Kalınlık (μm) $\pm$ SS	356,67 $\pm$ 25,03
Gerilme Direnci (MPa) $\pm$ SS	8,78 $\pm$ 2,12
Elastikiyet (%) $\pm$ SS	17,22 $\pm$ 5,33
Young's modül (MPa/%) $\pm$ SS	0,63 $\pm$ 0,06
Adezyon kuvveti (N) $\pm$ SS	2,38 $\pm$ 0,19
Su buharı Geçirgenliği Hızı (g/gün·m ²) $\pm$ SS	2302,00 $\pm$ 12,23
Oksijen Geçirgenliği (mg/l) $\pm$ SS	49,25 $\pm$ 8,17

Yara örtüsü formülasyonuna ait şişme derecesi sonuçları Şekil 3.53.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.53. Yara örtüsü formülasyonuna ait şişme derecesi sonuçları (n=3)

Optimize nanopartikül, liyofilize *H.perforatum* ekstresi ve yara örtüsü formülasyonunun *in vitro* salım profili Şekil 3.54.'te gösterilmiştir.



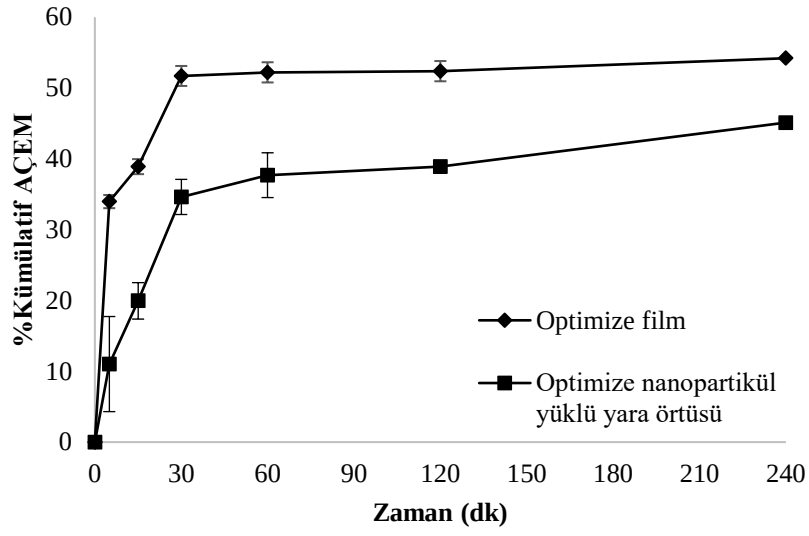
Şekil 3.54. Optimize nanopartikül, liyofilize *H.perforatum* ekstresi ve yara örtüsü formülasyonundan *in vitro* kümülatif hiperisin salım profili ($n=3$)

Şekil 3.54.'te verilen yara örtüsü formülasyonuna ait salım kinetiği bulguları Çizelge 3.29.'da verilmiştir.

Çizelge 3.29. Yara örtüsü formülasyonuna ait *in vitro* hiperisin salım kinetikleri

Kinetik Modelleri	Parametreler	Yara örtüsü
Sıfır Derece	k0	1,8687
	R ²	-1,0674
	R ² (adjusted)	-1,0674
	AIC	41,4888
	MSC	-1,1263
Birinci Derece	k1	0,0451
	R ²	0,3457
	R ² (adjusted)	0,3457
	AIC	35,7365
	MSC	0,0241
Higuchi	kH	11,8226
	R ²	0,6858
	R ² (adjusted)	0,6858
	AIC	32,0687
	MSC	0,7577
Korsmeyer-Peppas	kKP	18,4634
	R ²	0,9074
	R ² (adjusted)	0,8765
	AIC	27,9596
	MSC	1,5795
	n	0,3687
Hixson-Crowell	kHC	0,0127
	R ²	0,0131
	R ² (adjusted)	0,0131
	AIC	37,7911
	MSC	-0,3868
Weibull	R ²	0,9789
	R ² (adjusted)	0,9579
	AIC	22,5546
	MSC	2,6605
	α	4,2934
	β	0,4441

Optimize borik asit yüklü 3B basılmış film ve yara örtüsü formülasyonunun *in vitro* salım profili Şekil 3.55.'te gösterilmiştir.



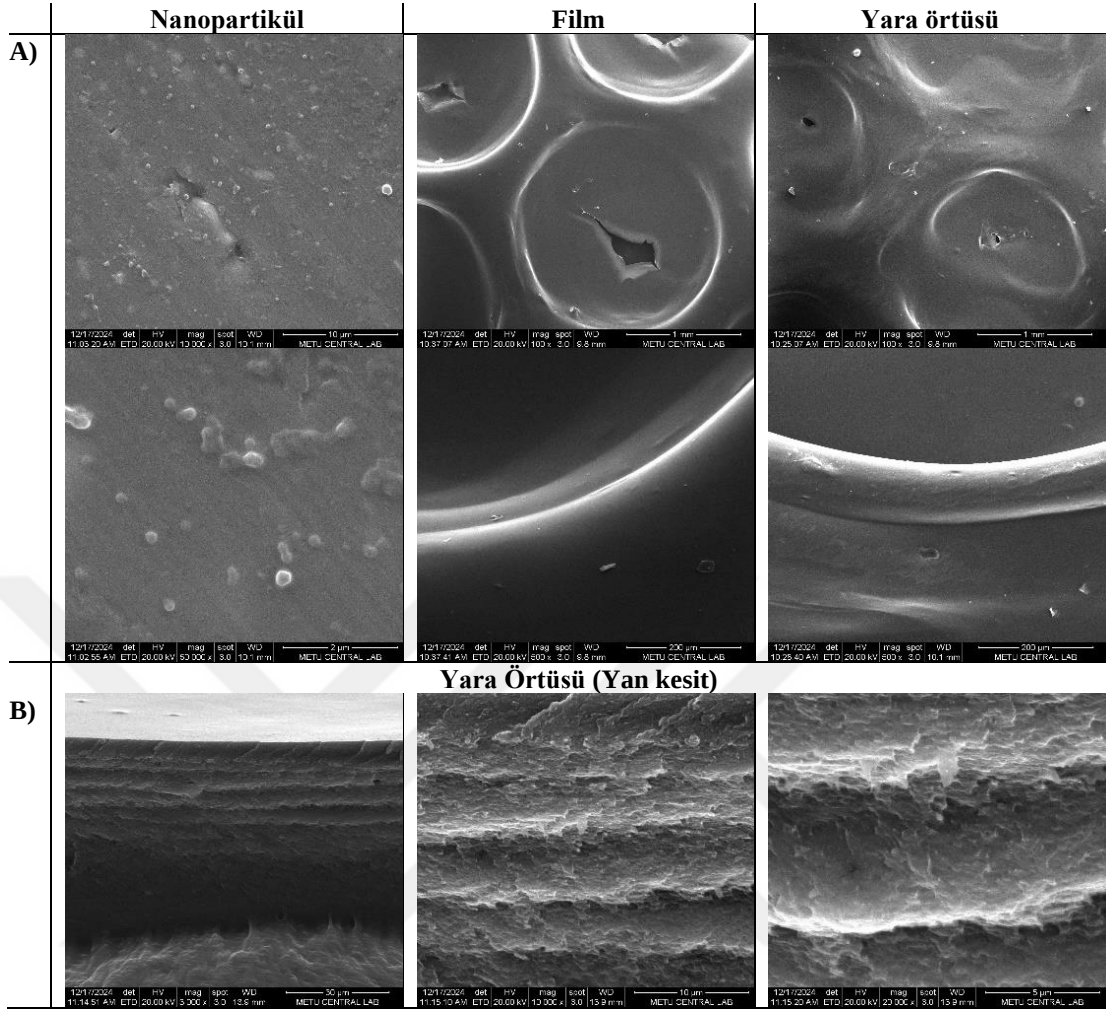
Şekil 3.55. Optimize film ve yara örtüsü formülasyonundan *in vitro* borik asit salım profili ($n=3$)

Şekil 3.55.'te verilen optimize borik asit yüklü 3B basılmış film ve yara örtüsü formülasyonuna ait salım kinetiği bulguları Çizelge 3.30.'da verilmiştir.

Çizelge 3.30. Optimize yara örtüsü formülasyonuna ait *in vitro* borik asit salım kinetikleri

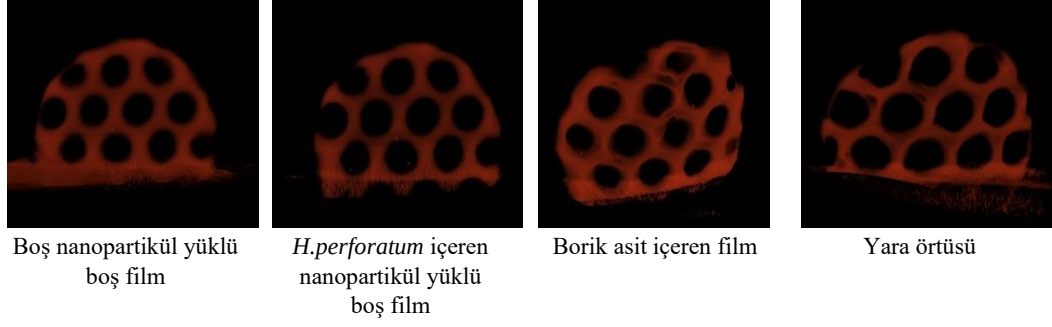
Kinetik Modelleri	Parametreler	Yara örtüsü
Sıfır Derece	k0	0,0979
	R ²	-2,0263
	R ² (adjusted)	-2,0263
	AIC	59,9409
	MSC	-1,3931
Birinci Derece	k1	0,0020
	R ²	-1,1083
	R ² (adjusted)	-1,1083
	AIC	57,4108
	MSC	-1,0316
Higuchi	kH	2,6615
	R ²	0,0669
	R ² (adjusted)	0,0669
	AIC	51,7051
	MSC	-0,2165
Korsmeyer-Peppas	kKP	12,0958
	R ²	0,7973
	R ² (adjusted)	0,7567
	AIC	43,0181
	MSC	1,0245
	n	0,2170
Hixson-Crowell	kHC	0,0006
	R ²	-1,4373
	R ² (adjusted)	-1,4373
	AIC	58,4259
	MSC	-1,1766
Weibull	R ²	0,8942
	R ² (adjusted)	0,8414
	AIC	40,4635
	MSC	1,3894
	α	10,0319
	β	0,3381

Optimum nanopartikül, optimum film ve yara örtüsü örneklerinin SEM analizi görselleri Şekil 3.56.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.56. Optimum nanopartikül, optimum film ve yara örtüsü örneklerine ait SEM görüntüsü (A) Yüzey görüntüleri, (B) Yara örtüsü formülasyonunun yan kesit görüntüsü

Mikro-BT ile 3B görüntüleri alınmış boş nanopartikül yüklü boş film, *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film ve yara örtüsü formülasyonlarına ait analiz sonuçları Şekil 3.57. ve Çizelge 3.31.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.57. Boş nanopartikül yüklü boş film, *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film ve yara örtüsü formülasyonlarına ait 3B mikro-BT görüntüleri

Çizelge 3.31. Boş nanopartikül yüklü boş film, *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film ve yara örtüsü formülasyonlarına ait mikro-BT tarama sonuçları

Parametreler	Boş nanopartikül yüklü boş film	<i>H.perforatum</i> içeren nanopartikül yüklü boş film	Borik asit içeren film	Yara örtüsü
Toplam hacim (TV) (mm ³)	814,69	842,00	842,00	678,61
Numune hacmi (Obj.V)	0,81	0,83	0,84	0,67
Nesne hacmi yüzdesi (Obj.V/TV(%))	0,09	0,09	0,09	0,09
Kapalı gözenek sayısı	6,00	10,00	10,00	11,00
Açık gözenek alanı hacmi (mm ³)	505,88	717,76	535,29	363,68
Açık gözeneklilik (%)	62,09	60,90	63,57	53,59
Konnektivite	68,00	14,00	25,00	11,00
Anizotropi derecesi	2,03	3,52	3,37	2,69

Yara örtüsü formülasyonunda $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\%60 \pm \%5$ bağıl nemde iklim dolabında stabilite sonuçları Çizelge 3.32.'de verilmiştir.

Çizelge 3.32. Yara örtüsü formülasyonunda $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\%60 \pm \%5$ bağıl nemde iklim dolabında stabilite sonuçları

Parametreler	Etkin madde	Başlangıç	1.Ay	3.Ay	6.Ay
Yükleme etkinliği (%)	Hiperisin	90,70	90,65	90,55	90,48
	Borik asit	98,74	98,69	98,62	98,57
In vitro salım (%)	Hiperisin (48.sa)	52,40	52,10	51,91	51,82
	Borik asit (15.dk)	19,95	19,82	19,63	19,48
Adezyon kuvveti (N)	-	2,38	2,36	2,35	2,35

3.9. Antimikrobiyal Aktivite Analizlerine Ait Bulgular

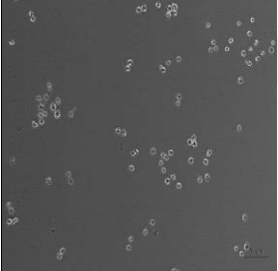
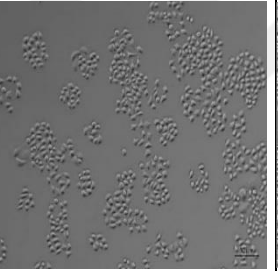
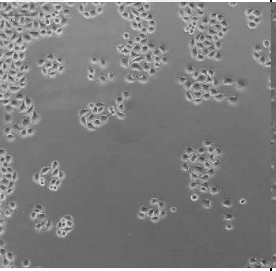
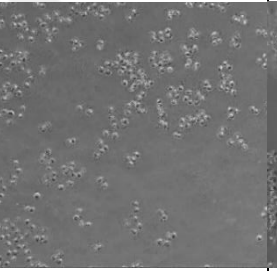
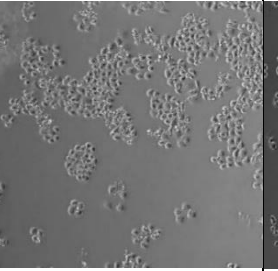
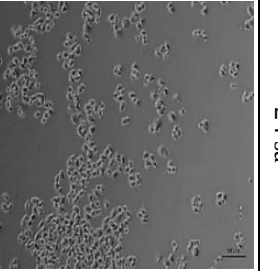
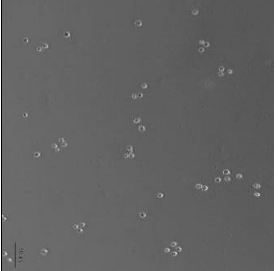
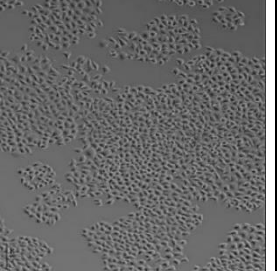
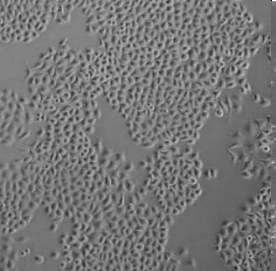
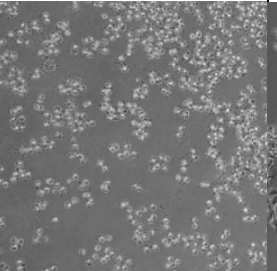
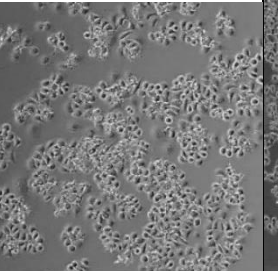
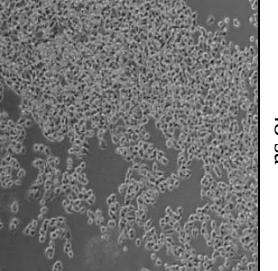
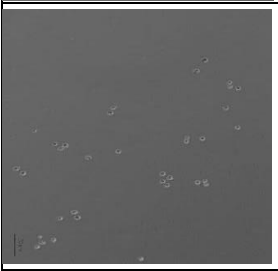
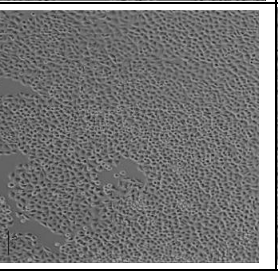
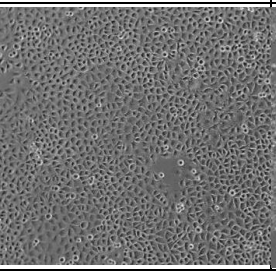
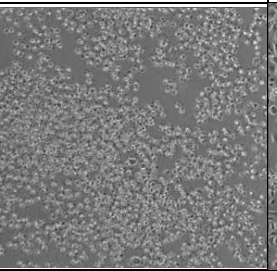
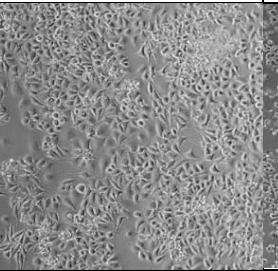
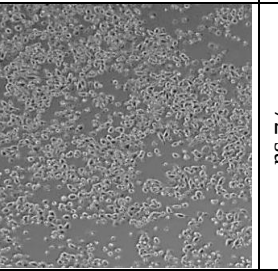
Bölüm 2.2.11.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite analizlerine ait deney sonuçları Çizelge 3.33.'te verilmiştir.

Çizelge 3.33. Antimikrobiyal aktivite analizlerine ait deney sonuçları

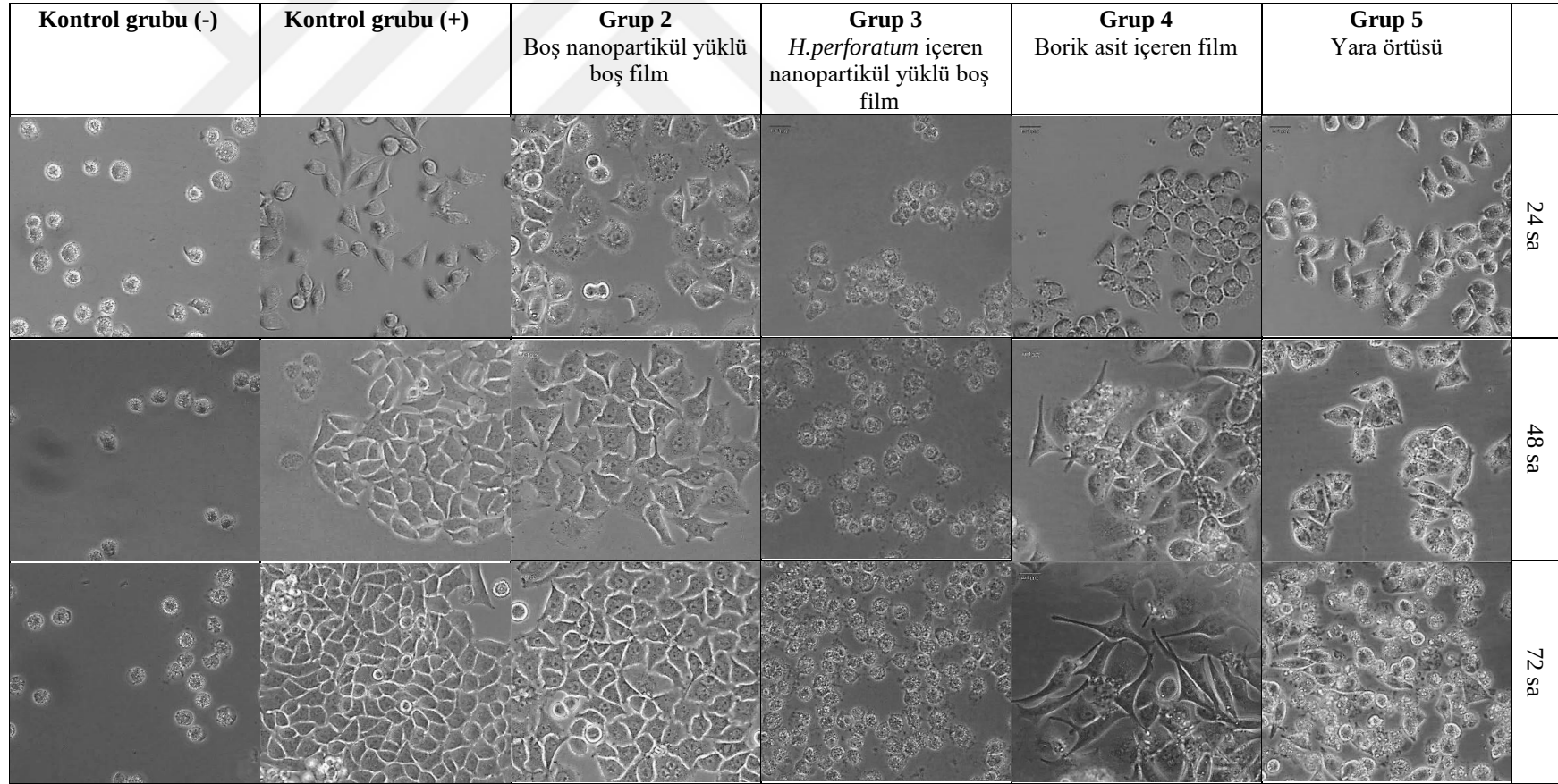
Grup Adı	<i>E. coli</i>	log azalma	% azalma	<i>S. aureus</i>	log azalma	% azalma
Kontrol grubu	14x10 ⁹	-	-	78x10 ¹²	-	-
Boş nanopartikül yüklü boş film	12x10 ⁷	2,07	99,1	23x10 ⁵	7,53	100
<i>H.perforatum</i> içeren nanopartikül yüklü boş film	5x10 ⁸	1,45	96,4	17x10 ⁵	7,66	100
Borik asit içeren film	8x10 ⁸	1,24	94,3	10x10 ⁵	7,89	100
Yara örtüsü	7x10 ⁷	2,30	99,5	11x10 ⁶	6,85	100

3.10. Hücre Kültürü Deneylerine Ait Bulgular

Hücrelere ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 24, 48 ve 72 saat sonra deneysel gruplara (negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu, Grup 2: Boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: Borik asit içeren film ve Grup 5: Yara örtüsü) göre hücre tabakası yayılımı ve ölü hücre miktar faz kontrast mikroskopi ile 10x ve 40x büyütmede incelenmiştir. 24, 48 ve 72 saatte gözlemlenen hücre tabakası yayılımı Şekil 3.58-3.60.'ta verilmektedir. Bu çalışmada kullanılan numunelerin tamamı Bölüm 2.2.12.1.'de açıklandığı şekilde sterilize edilerek kullanılmıştır.

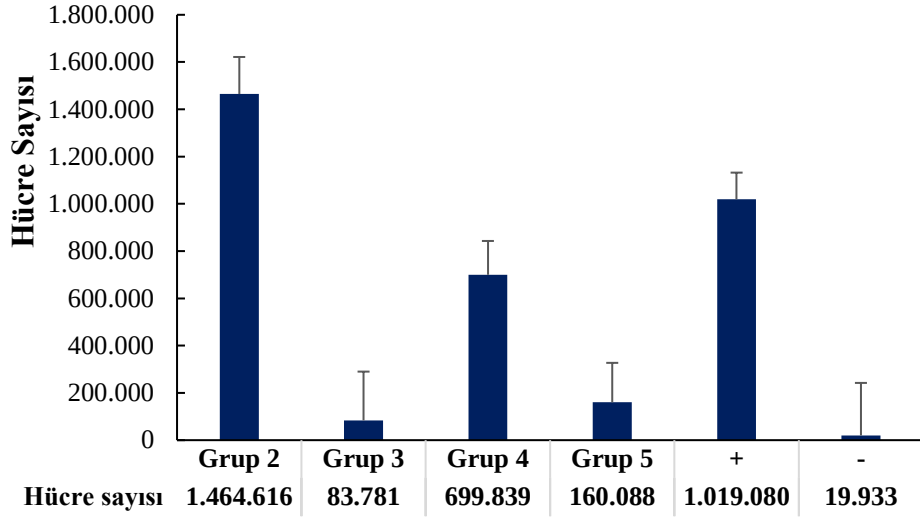
Kontrol grubu (-)	Kontrol grubu (+)	Grup 2 Boş nanopartikül yükü boş film	Grup 3 <i>H.perforatum</i> içeren nanopartikül yükü boş film	Grup 4 Borik asit içeren film	Grup 5 Yara örtüsü	
						24 sa
						48 sa
						72 sa

Şekil 3.58. Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 24, 48 ve 72 saat sonra deneysel gruplara göre hücre tabakası yayılımının değişimi (10x büyütme)

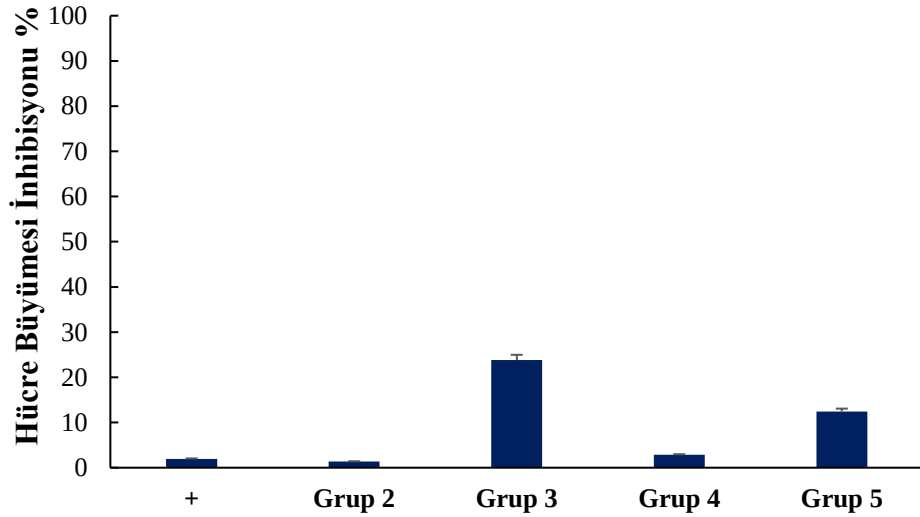


Şekil 3.59. Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 24, 48 ve 72 saat sonra deneysel gruplara göre hücre tabakası yayılımının değişimi (40x büyütme)

A)



B)



Şekil 3.60. Ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden 72 saat sonra deneysel gruplara göre (negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu, Grup 2: boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: Borik asit içeren film ve Grup 5: yara örtüsü) (A) Canlı hücre sayısının değişimi, (B) % hücre büyümesi inhibisyonu; sonuçlar pozitif kontrol grubuna bağlı olarak verilmiştir.

Yapılan mikroskobik inceleme ve hücre sayımı sonuçlarına göre, deneysel grupların sitotoksikite testi değerlendirme kriterleri puanlama cetveline göre sonuçları Çizelge 3.34.'te sunulmaktadır.

Çizelge 3.34. Sitotoksisite testi değerlendirme kriterleri puanlama cetveline göre sonuçlar

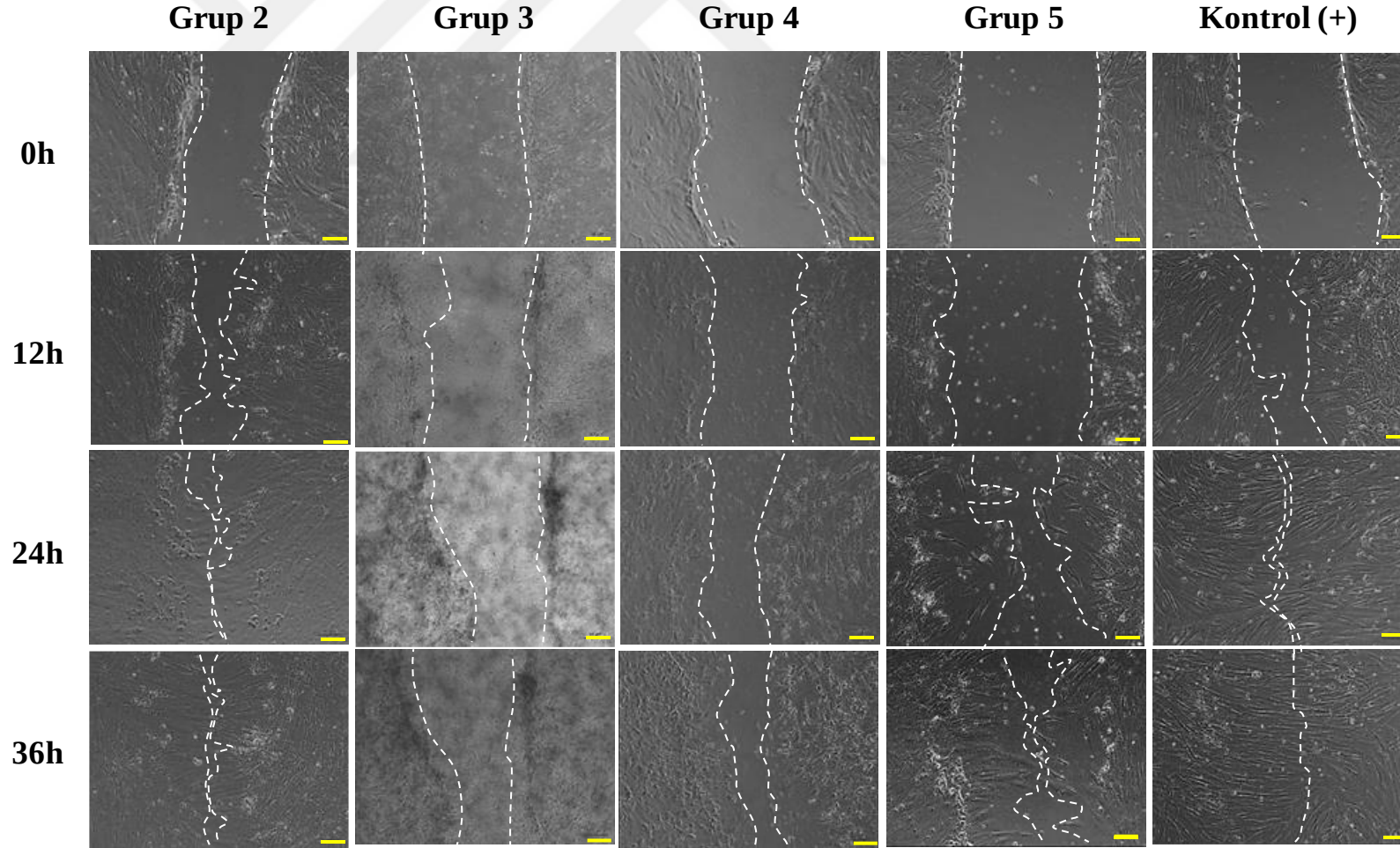
Kriterler	Grup 2 Boş nanopartikül yükü boş film	Grup 3 <i>H.perforatum</i> içeren nanopartikül yükü boş film	Grup 4 Borik asit içeren film	Grup 5 Yara örtüsü
Hücre tabakası yayılımı (Confluency)	1	2	2	2
Hücre morfolojisindeki değişim	0	3	1	1
Ölü hücre miktarı (yüzen hücreler)	0	0	1	1
Hücre büyümesi inhibisyonu	0	1	0	1

Bu sonuçlara göre, test edilen gruplar için sitotoksik cevap indeksi (Çizelge 2.23.) ve sitotoksisite değerlendirme sonuçları Çizelge 3.35.’te sunulmaktadır.

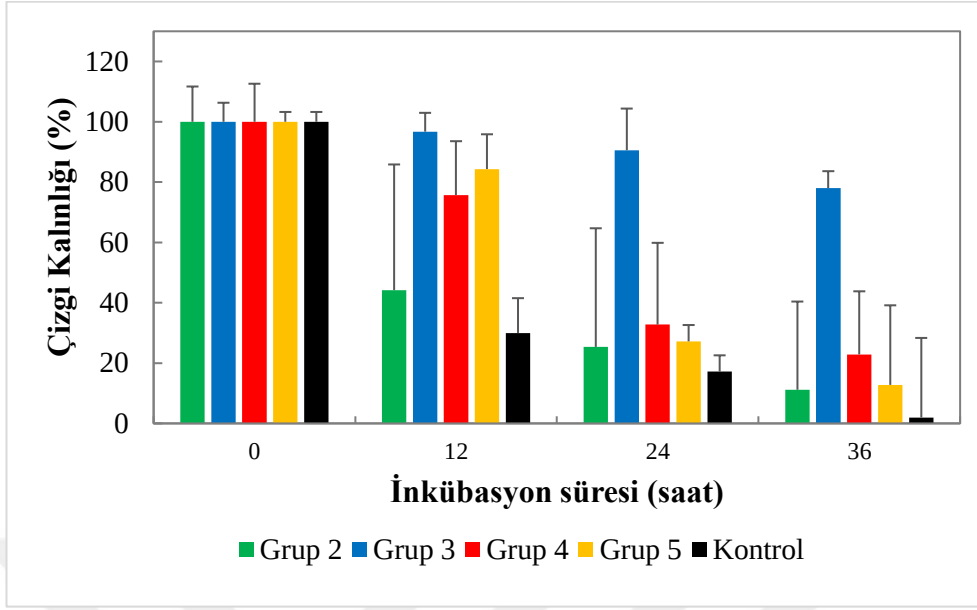
Çizelge 3.35. Test edilen gruplar için sitotoksisite değerlendirme sonuçları

	Sitotoksik cevap indeksi	“Malzeme Sitotoksiktir”
Grup 2	0,3	Hayır
Grup 3	2,6	Hayır
Grup 4	1,3	Hayır
Grup 5	2,3	Hayır

Deney gruplarından Bölüm 2.2.12.3.’te açıklandığı şekilde gerçekleştirilen scratch assay testi sonucunda elde edilen mikroskopik inceleme görüntüleri Şekil 3.61.’de sunulmaktadır. Ayrıca, çizgi kalınlığı ve inkübasyon süresine bağlı olarak çizginin kapanması durumu, her grup için değerlendirilerek Şekil 3.62.’de sunulmuştur.



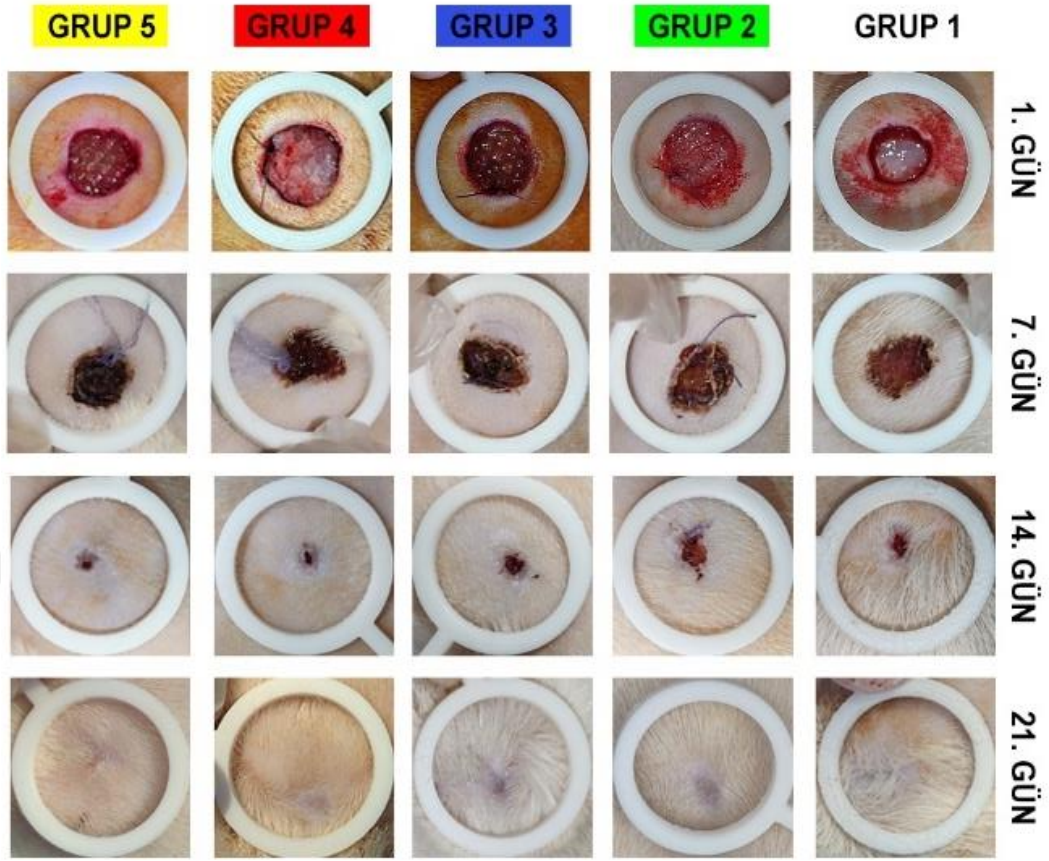
Şekil 3.61. Gruplara ekstraksiyon sıvılarının eklenmesinden 0, 12, 24, 36 saat sonra çizik alanlara hücre göçünün mikroskopik incelemesi (ölçek: 50 µm).



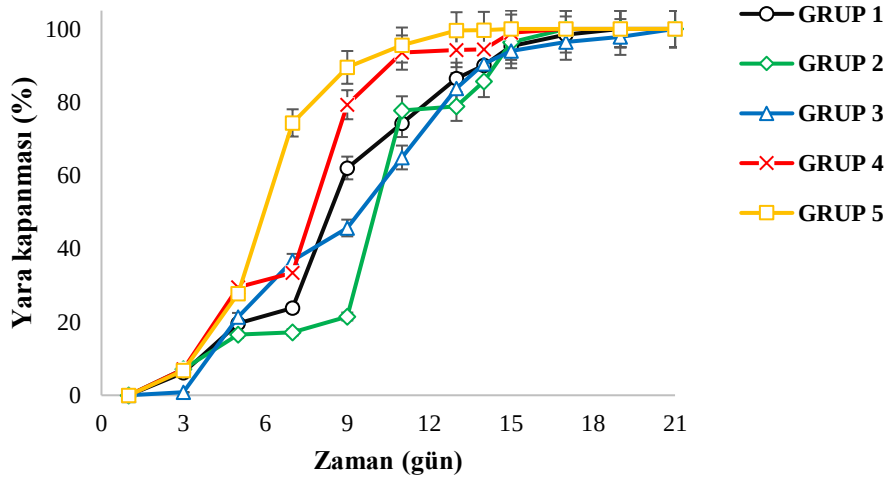
Şekil 3.62. Çizgi kalınlığı (%) ve inkübasyon süresine (saat) bağlı olarak çizginin kapanması durumunun değerlendirilmesi

3.11. Hazırlanan Formülasyonların Tedavideki Etki Gücünün *In Vivo* Değerlendirilmesine Ait Bulgular

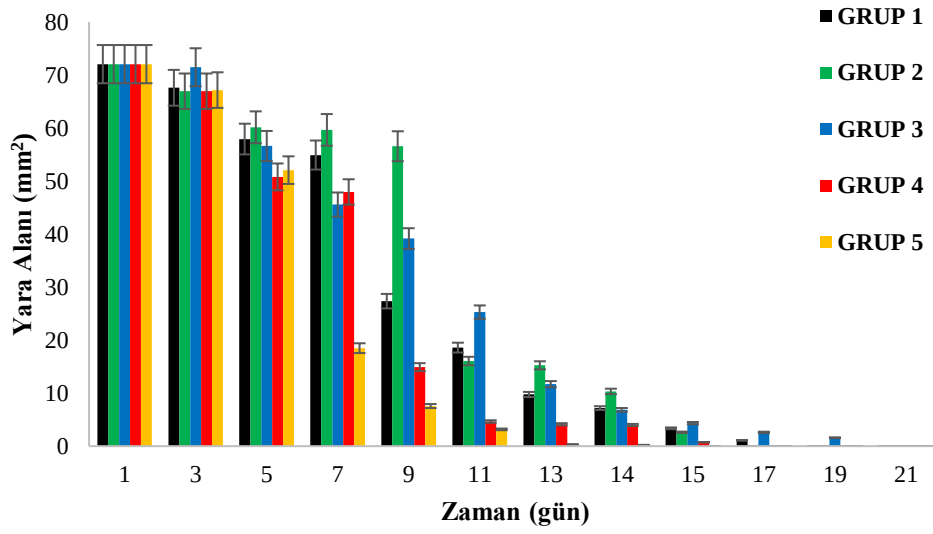
Çizelge 2.24.'te verilen formülasyonların (Grup 1: Negatif kontrol grubu, Grup 2: Boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: *H.perforatum* nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: Borik asit içeren film ve Grup 5: Yara örtüsü) tedavideki etki gücünün Bölüm 2.2.13.'te açıklanan şekilde yapılan *in vivo* deneylerle değerlendirilmesine dair görseller, yara kapanma yüzdesi ve yara alanı verileri Şekil 3.63.-3.65.'te verilmiştir.



Şekil 3.63. *In vivo* uygulanan formülasyonlarda zamana bağlı yara kapanmasının takibine ait görseller



Şekil 3.64. *In vivo* uygulanan formülasyonlarda zamana bağlı yara kapanma yüzdesinin gruplara göre takibine ait sonuçlar



Şekil 3.65. *In vivo* uygulanan formülasyonlarda zamana bağlı yara alanındaki değişimin gruplara göre takibine ait sonuçlar

Bölüm 2.2.13.1.'de açıklandığı şekilde hazırlanan formülasyonların (Grup 1: negatif kontrol grubu, Grup 2: boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: *H.perforatum* nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: Borik asit içeren film ve Grup 5: yara örtüsü) tedavideki etki gücünün *in vivo* çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin 3B mikroyapılara ait Mikro-BT sonuçları Çizelge 3.36.'da verilmiştir.

Çizelge 3.36. Hazırlanan formülasyonların tedavideki etki gücünün *in vivo* çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin 3B mikroyapılarına ait Mikro-BT sonuçları (n=6)

	GRUP 1			GRUP 2		
	7.gün	14.gün	21.gün	7.gün	14.gün	21.gün
Doku hacmi	1045,03 ± 47,51	1112,08 ± 42,55	1165,32 ± 95,20	1154,90 ± 78,04	1110,90 ± 78,04	1072,90 ± 84,25
Nesne hacmi	2,70 ± 0,26	2,26 ± 0,45	3,02 ± 0,66	2,73 ± 0,74	3,41 ± 0,60	3,03 ± 0,63
Yüzde nesne hacmi	0,26 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,26 ± 0,07	0,23 ± 0,05	0,31 ± 0,07	0,28 ± 0,06
Doku yüzeyi	429,03 ± 4,01	409,85 ± 24,64	414,07 ± 14,95	413,72 ± 12,51	995,20 ± 1435,96	428,54 ± 3,39
Nesne yüzeyi	33,36 ± 3,96	25,35 ± 5,81	35,66 ± 9,88	22,51 ± 2,46	36,64 ± 7,47	31,54 ± 7,69
Nesne yüzey dansitesi	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Strüktür model indeksi	2,32 ± 0,66	2,26 ± 0,46	1,91 ± 0,59	3,55 ± 0,26	2,55 ± 0,28	2,43 ± 0,33
Anizotropi derecesi	1,68 ± 0,46	1,56 ± 0,31	1,88 ± 0,46	1,51 ± 0,36	1,90 ± 0,22	1,80 ± 0,28
Kapalı por sayısı	17,40 ± 3,21	18,00 ± 7,77	13,50 ± 4,93	6,67 ± 5,13	7,83 ± 2,23	9,71 ± 7,74
Euler sayısı	-1,40 ± 17,71	6,67 ± 23,38	-18,00 ± 31,73	-12,75 ± 6,82	-28,75 ± 23,89	-11,14 ± 10,16
Konnektivite	97,40 ± 9,37	103,00 ± 5,29	132,25 ± 29,67	76,50 ± 4,64	64,67 ± 33,21	84,43 ± 21,31
Nesne kalınlığı	0,37 ± 0,06	0,45 ± 0,13	0,39 ± 0,10	0,31 ± 0,03	0,44 ± 0,00	0,48 ± 0,08
Nesne ayrımı	0,62 ± 0,13	0,61 ± 0,13	0,51 ± 0,12	0,35 ± 0,03	0,86 ± 0,00	0,76 ± 0,20
Nesne sayısı	0,89 ± 0,17	0,84 ± 0,27	1,56 ± 0,06	1,89 ± 0,09	0,68 ± 0,00	0,75 ± 0,27

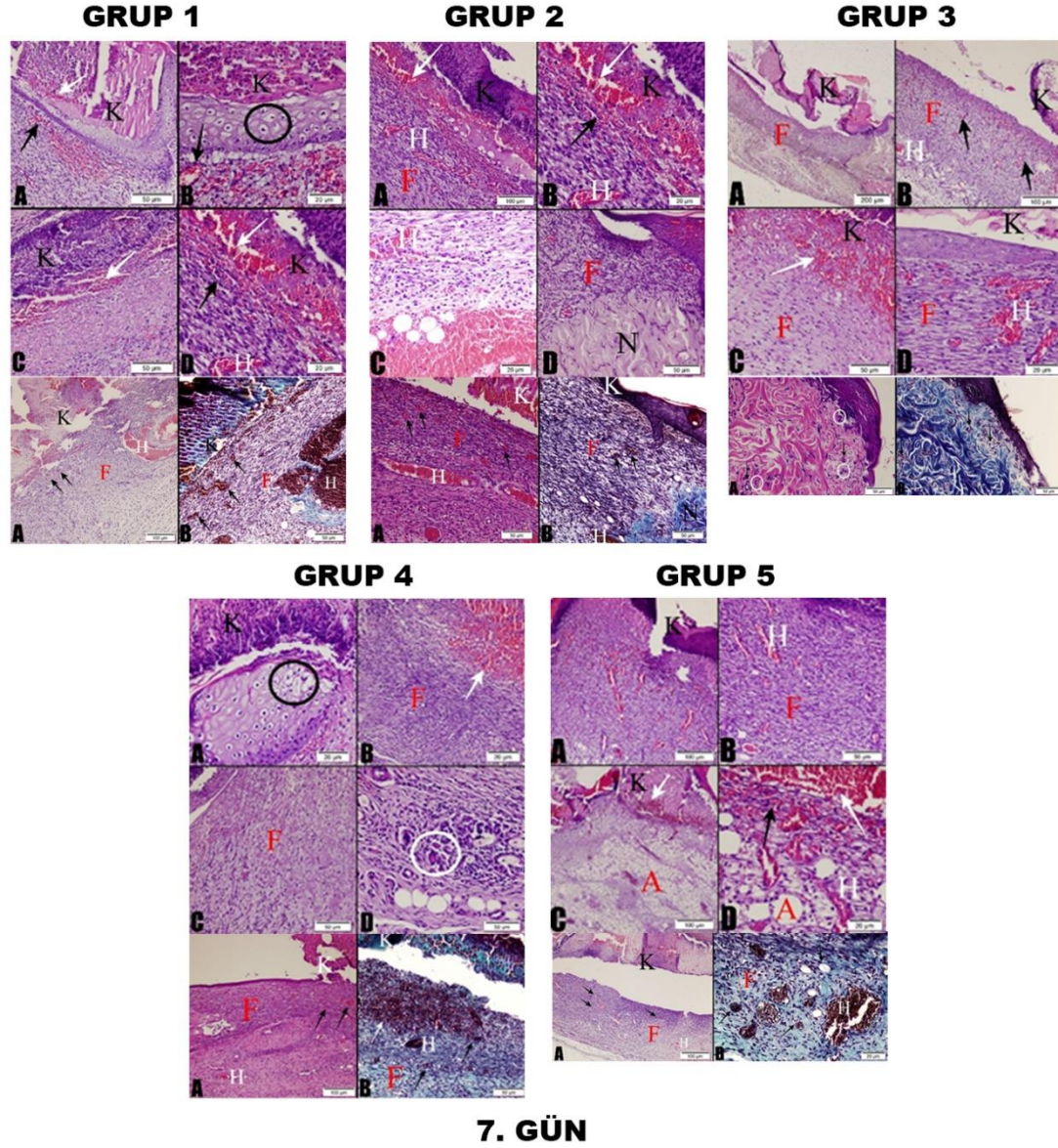
Çizelge 3.36. Devam. Hazırlanan formülasyonların tedavideki etki gücünün *in vivo* çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin 3B mikroyapılarına ait Mikro-BT sonuçları (n=6)

	Grup 3			GRUP 4		
	7.gün	14.gün	21.gün	7.gün	14.gün	21.gün
Doku hacmi	1173,44 ± 110,25	1145,72 ± 93,48	1178,65 ± 115,27	1142,15 ± 84,24	1217,41 ± 62,45	1254,60 ± 214,62
Nesne hacmi	5,88 ± 0,49	5,01 ± 0,66	4,72 ± 1,28	8,55 ± 1,96	8,39 ± 0,76	8,73 ± 0,37
Yüzde nesne hacmi	0,50 ± 0,03	0,44 ± 0,08	0,40 ± 0,11	0,76 ± 0,20	0,69 ± 0,09	0,72 ± 0,11
Doku yüzeyi	613,43 ± 12,62	598,16 ± 5,15	684,83 ± 52,89	597,08 ± 44,88	538,90 ± 12,72	494,65 ± 33,59
Nesne yüzeyi	47,60 ± 5,77	61,18 ± 3,99	35,76 ± 6,01	29,36 ± 5,07	23,70 ± 2,95	23,62 ± 5,04
Nesne yüzey dansitesi	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Strüktür model indeksi	3,00 ± 0,44	3,13 ± 0,38	3,08 ± 0,44	2,49 ± 0,25	2,52 ± 0,21	3,01 ± 0,34
Anizotropi derecesi	1,55 ± 0,30	1,87 ± 0,46	2,18 ± 0,31	2,61 ± 0,46	1,68 ± 0,46	1,75 ± 0,35
Kapalı por sayısı	117,00 ± 5,29	111,00 ± 9,75	91,00 ± 42,27	144,43 ± 19,47	204,00 ± 11,92	216,00 ± 12,62
Euler sayısı	-17,71 ± 22,56	-9,14 ± 12,46	-13,00 ± 14,71	-10,57 ± 8,18	-18,60 ± 27,51	-25,50 ± 19,60
Konnektivite	430,64 ± 25,93	522,43 ± 40,79	610,00 ± 28,27	631,71 ± 30,21	712,80 ± 22,40	748,29 ± 15,80
Nesne kalınlığı	0,37 ± 0,07	0,44 ± 0,04	0,39 ± 0,11	0,42 ± 0,13	0,34 ± 0,02	0,41 ± 0,05
Nesne ayrımı	0,49 ± 0,07	0,52 ± 0,04	0,53 ± 0,06	0,65 ± 0,11	0,47 ± 0,04	0,47 ± 0,03
Nesne sayısı	1,14 ± 0,17	0,95 ± 0,06	1,00 ± 0,15	0,93 ± 0,09	0,98 ± 0,11	0,99 ± 0,03

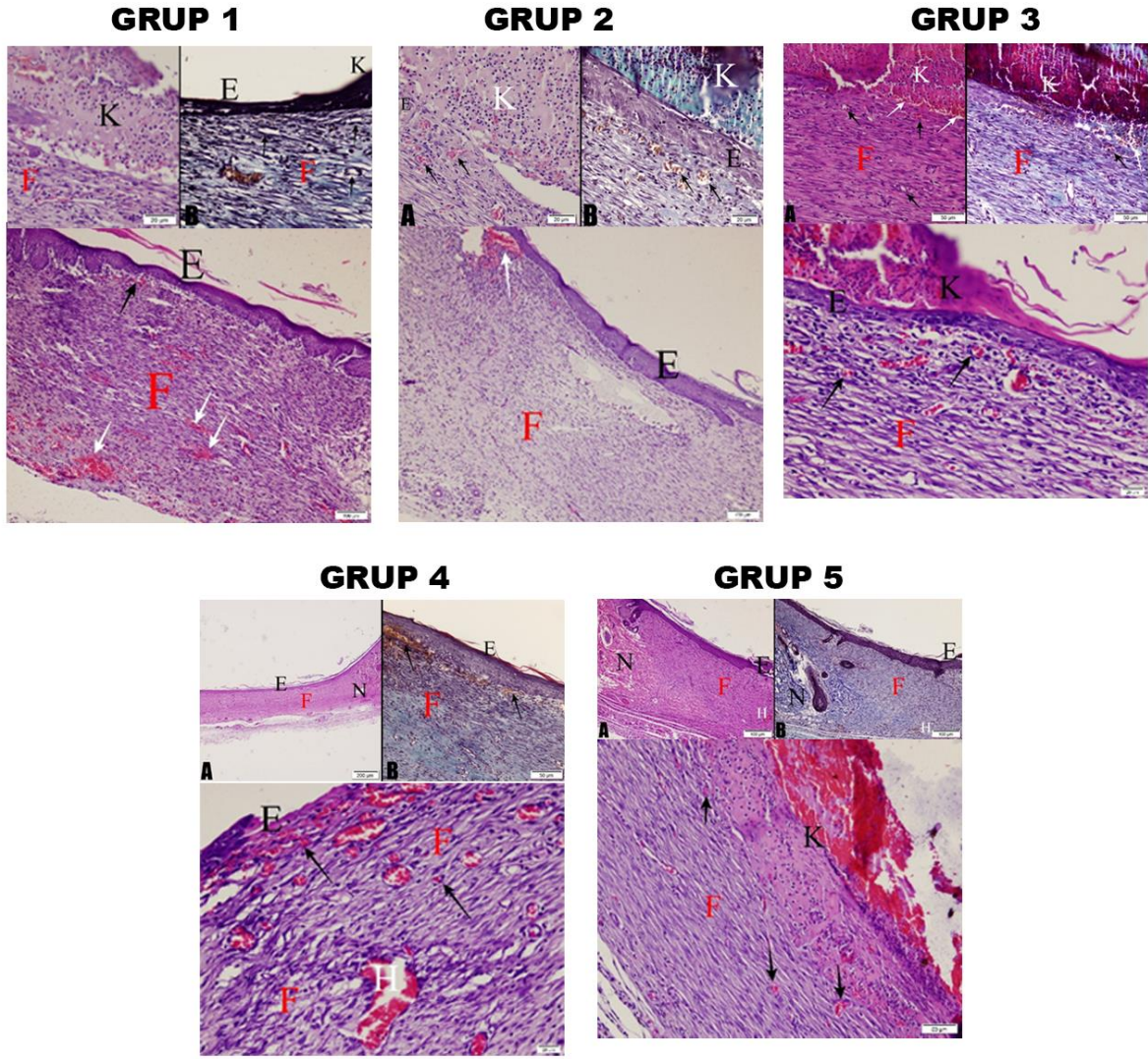
Çizelge 3.36. Devam. Hazırlanan formülasyonların tedavideki etki gücünün *in vivo* çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin 3B mikroyapılarına ait Mikro-BT sonuçları (n=6)

	GRUP 5		
	7.gün	14.gün	21.gün
Doku hacmi	1321,69 ± 96,46	1326,50 ± 92,79	1222,44 ± 98,46
Nesne hacmi	12,87 ± 0,57	13,21 ± 0,61	12,90 ± 0,63
Yüzde nesne hacmi	0,92 ± 0,03	1,06 ± 0,04	1,06 ± 0,05
Doku yüzeyi	638,74 ± 7,11	624,94 ± 19,25	648,20 ± 34,89
Nesne yüzeyi	27,45 ± 4,61	34,75 ± 5,21	29,99 ± 5,02
Nesne yüzey dansitesi	0,46 ± 0,27	0,70 ± 0,23	0,47 ± 0,31
Strüktür model indeksi	3,49 ± 0,23	3,50 ± 0,20	3,40 ± 0,35
Anizotropi derecesi	1,77 ± 0,52	2,04 ± 0,36	2,67 ± 0,46
Kapalı por sayısı	366,57 ± 53,84	585,03 ± 67,44	416,75 ± 139,75
Euler sayısı	-10,00 ± 10,42	-10,71 ± 13,66	-12,88 ± 9,99
Konnektivite	1014,86 ± 112,09	1088,29 ± 134,60	1129,25 ± 228,98
Nesne kalınlığı	0,54 ± 0,04	0,33 ± 0,04	0,35 ± 0,09
Nesne ayrımı	0,62 ± 0,10	0,56 ± 0,03	0,61 ± 0,16
Nesne sayısı	0,81 ± 0,11	1,02 ± 0,21	0,88 ± 0,03

Bölüm 2.2.13.2.'de açıklandığı şekilde hazırlanan formülasyonların (Grup 1: Negatif kontrol grubu, Grup 2: Boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: *H.perforatum* nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: Borik asit içeren film ve Grup 5: Yara örtüsü) tedavideki etki gücünün değerlendirildiği *in vivo* çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin histopatoloji sonuçları Şekil 3.66.'da verilmiştir.

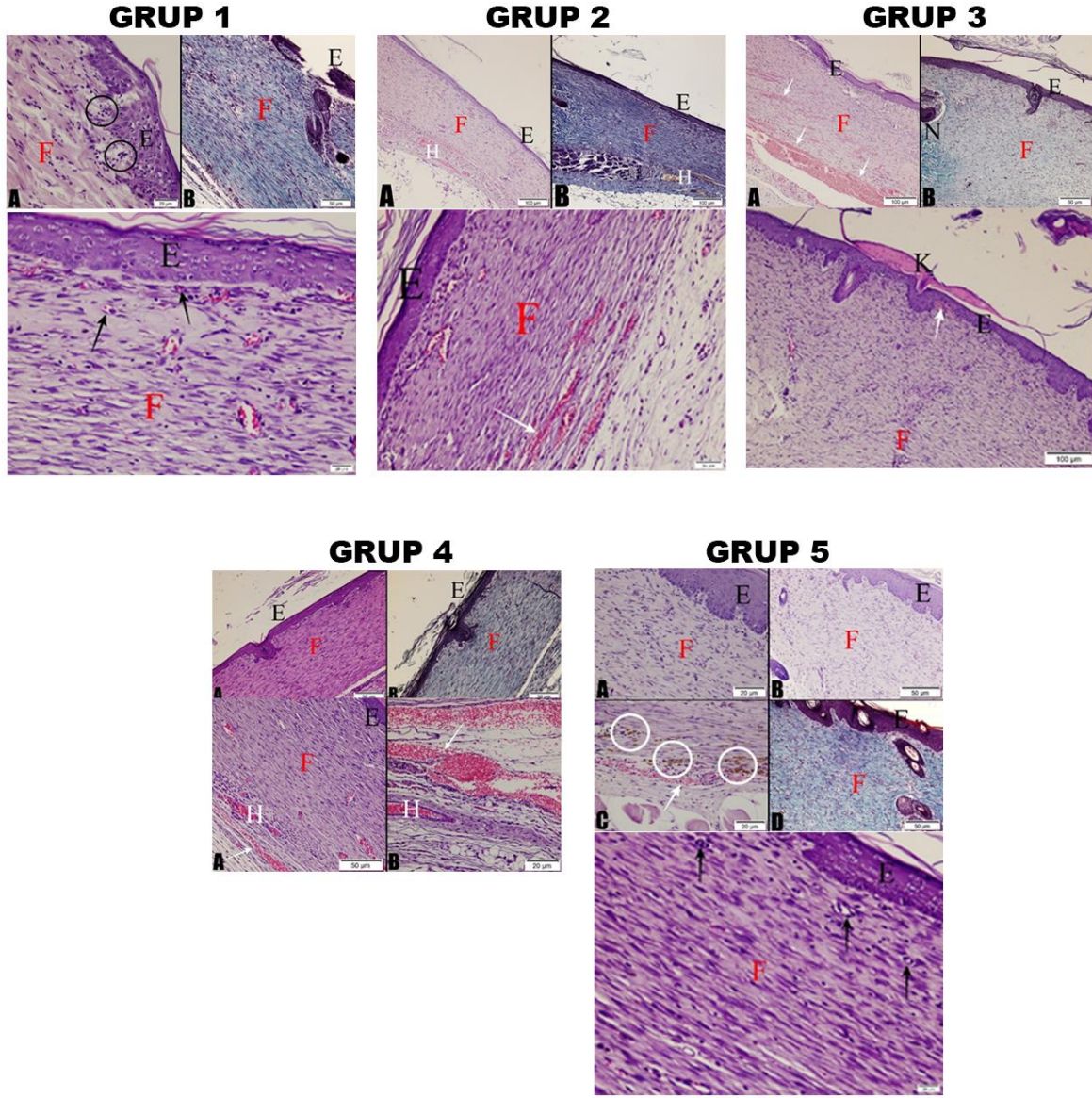


Şekil 3.66. Hazırlanan formülasyonların tedavideki etki gücünün değerlendirildiği *in vivo* çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin histopatoloji sonuçları Şekillerde Kabuk (K), Fibröz doku (F), Hiperemik damarlar (H), Neovaskularizasyon (oklar veya siyah oklar), Kanama (beyaz oklar), Yara kenarındaki normal dermis dokusu (N), Epitel (E), Adipoz doku (A) ve Hemosiderofaji (beyaz daireler) gösterilmiştir. Hidropik dejenerasyon alanları ise siyah daireler ile işaretlenmiştir.



14. GÜN

Şekil 3.66. Devam. Hazırlanan formülasyonların tedavideki etki gücünün değerlendirildiği *in vivo* çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin histopatoloji sonuçları Şekillerde Kabuk (K), Fibröz doku (F), Hiperemik damarlar (H), Neovaskülarizasyon (oklar veya siyah oklar), Kanama (beyaz oklar), Yara kenarındaki normal dermis dokusu (N), Epitel (E), Adipoz doku (A) ve Hemosiderofaji (beyaz daireler) gösterilmiştir. Hidropik dejenerasyon alanları ise siyah daireler ile işaretlenmiştir.



21. GÜN

Şekil 3.66. Devam. Hazırlanan formülasyonların tedavideki etki gücünün değerlendirildiği *in vivo* çalışmada 7., 14. ve 21.günde alınan deri örneklerinin histopatoloji sonuçları Şekillerde Kabuk (K), Fibröz doku (F), Hiperemik damarlar (H), Neovaskülarizasyon (oklar veya siyah oklar), Kanama (beyaz oklar), Yara kenarındaki normal dermis dokusu (N), Epitel (E), Adipoz doku (A) ve Hemosiderofaji (beyaz daireler) gösterilmiştir. Hidropik dejenerasyon alanları ise siyah daireler ile işaretlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında geliştirilen nanopartikül yüklü film şeklindeki yara örtüsü formülasyonlarının *in vitro* ve *in vivo* testlerle kapsamlı şekilde değerlendirilmesi sonucunda elde edilen bulgulara ait tartışmalar, mevcut literatür verileri ışığında yapılmıştır. Tartışma bölümünde; formülasyonların karakterizasyon parametreleri, antimikrobiyal ve hücre kültürü deneylerinden elde edilen veriler ile hayvan modeli üzerinden yapılan yara iyileşmesi değerlendirmeleri bir bütün olarak ele alınarak, sistemin yara iyileştirme potansiyeli, etkin madde salımı ve doku ile etkileşimi açısından kapsamlı bir karşılaştırma sunulmuştur. Bu değerlendirmeler, literatürdeki benzer çalışmalar ile karşılaştırmalı biçimde yorumlanarak, geliştirilen sistemin özgün yönleri ve klinik uygulama potansiyeli vurgulanmıştır.

Total hiperisin analizi için metanol ortamında UV-Vis spektrofotometre ile maksimum absorbans verdiği dalga boyunun 588 nm olduğu ve literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.1.) (EP10). Bu ortamda kalibrasyon çalışmaları tamamlanmış ve determinasyon katsayısı (r^2) 0,9990 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2.). Bu sonuç total hiperisin miktarının bilinmeyen numunelerden analizinde sağlıklı bir şekilde bu denklemlerle tespit edilebileceğini göstermiştir.

Hiperisin ve psödohiperisin miktar tayini için EP10’da verilen HPLC yöntemi modifiye edilerek metot geliştirilmiştir. Farmakopede yer alan mobil faz bileşenlerinin (Etilasetat: Metanol: Fosfat tamponu (pH 2,0) hacimce 39:160:41’den 26:66:8 oranlarına değiştirilmiş) ve sıcaklığın (40°C’den 20°C’ye düşürülmüş) modifiye edilmesiyle alıkonma süresi farmakope yöntemiyle tespit edilen 15 dk’dan 3,7 dk’ya indirilerek ardışık deneylerin daha kısa sürede analiz edilebileceği bir metot geliştirilmiştir.

Geliştirilen HPLC metodu ile Çizelge 2.1.’de belirtilen çalışma koşulları kullanılarak hiperisin ve psödohiperisinin metanol ortamında kalibrasyonları tamamlanmıştır. Tüm ortamlarda her iki etkin madde için de maksimum absorbans verdiği dalga boyu literatürle uyumlu şekilde 590 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3.-3.4.) (EP10). Hiperisin ve psödohiperisin için metanolde artan konsantrasyonlarda hazırlanan numunelerinin kromatogramları üst üste getirildiğinde maksimum absorbans noktasında hiçbir kayma olmadan üst üste gelen piklerin artan konsantrasyonlarla uyumlu şekilde yükseldiği de tespit edilmiştir (Şekil 3.5. ve 3.7.). Metanol ortamındaki kalibrasyon denklemlerinin determinasyon

katsayıları sırasıyla (r^2) hiperisin için 0,9992 ve psödohiperisin için 0,9990 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6. ve 3.8.). Determinasyon katsayısının bire yakın olması kalibrasyonlardan hesaplanan absorpsiyon değerine karşılık gelen hiperisin ve psödohiperisin konsantrasyonlarının güvenilir şekilde tespit edilebileceğini kanıtlamıştır.

Hiperisin miktar tayini için HPLC yöntemiyle Çizelge 2.1.'de belirtilen çalışma koşulları kullanılarak *in vitro* çözünme ortamında (PBS pH 7,4; etanol 3:1) kalibrasyonları tamamlanmıştır. Maksimum absorbans verdiği dalga boyu literatürle uyumlu şekilde 590 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9.) (EP10, 2021). Hiperisin için metanol ortamında olduğu gibi PBS ortamında da artan konsantrasyonlarda hazırlanan numunelerinin kromatogramları üst üste getirildiğinde maksimum absorbans noktasında hiçbir kayma olmadan üst üste gelen piklerin uyumlu şekilde yükseldiği de tespit edilmiştir (Şekil 3.10.). Determinasyon katsayısı (r^2) hiperisin için 0,9991 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11.). Determinasyon katsayısının bire yakın olması kalibrasyonlardan hesaplanan absorpsiyon değerine karşılık gelen hiperisin konsantrasyonlarının güvenilir şekilde tespit edilebileceğini kanıtlamıştır.

Borik asit analizi için %1,5 (h/h) sulu asetik asit ortamında ve *in vitro* çözünme ortamında UV-Vis spektrofotometre ile yapılan kalibrasyon çalışmalarında her iki ortam için maksimum absorbans verdiği dalga boyu sırasıyla 430 ve 418 nm olarak bulunmuş ve literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Endo vd., 2013; Koseoglu ve Kolak, 2010; Matoh vd., 1997; Mohammed vd., 2014; Rao ve Aggarwal, 2008; Sah ve Brown, 1997; Sarkar ve Singh, 2018).

Determinasyon katsayısı (r^2) her iki ortam için sırasıyla 0,9991 ve 0,9981 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.12. ve Şekil 3.13.). Determinasyon katsayısının bire yakın olması kalibrasyonlardan hesaplanan absorpsiyon değerine karşılık gelen borik asit konsantrasyonlarının şekilde tespit edilebileceğini göstermiştir.

Etkin maddelerin geliştirilen HPLC ve/veya UV spektrofotometre ile miktar tayini için elde edilen analitik validasyon çalışmaları (Bölüm 2.2.4.) sonucunda tüm doğruluk verilerinin % BSS değerleri %2'nin altında bulunmuştur (Çizelge 3.1.-3.6.). Bu da belirlenen konsantrasyon aralığı içerisinde tüm yöntemlerin doğruluğunu ispatlamaktadır. Tüm kesinlik çalışmalarının sonunda; % BSS değerlerinin %2'nin altında olduğu görülmüş ve yöntemin tekrarlanabilirliği ve orta kesinliği (günler arası) ispatlanmıştır (Çizelge 3.7.-3.12.). İncelenen etkin maddelerim tüm ortamlarda elde edilen kalibrasyon verileri ile hesaplanan DL ve QL

verileri, her bir yöntem için kalibrasyon doğrusunu oluşturan en alt konsantrasyon değerinden daha da küçük konsantrasyonların hassasiyetle ölçülebileceğini göstermiştir (Çizelge 3.13.). Yapılan tüm analizlerde kalibrasyon doğrularının %95 güven aralığı içinde olduğu saptanmıştır (Şekil 3.14.-3.19. ve Çizelge 3.14.). Ayrıca elde edilen determinasyon katsayısının 1'e yakın olması, çalışılan konsantrasyonlarda yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir. Formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin etkin maddelerin analizinde kullanılan dalga boyunda pik vermediği de tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre geliştirilen analiz yöntemlerinin analitik validasyon verileri ile doğru, kesin, tekrar edilebilir sonuçlar alınabileceği tespit edilmiş ve kalibrasyon aralığındaki konsantrasyonların tespitinde güvenilir şekilde kullanılabileceği kanıtlanmıştır.

Avrupa Farmakopesi'ne (EP10) göre susuz *H.perforatum* ekstresinde hiperisin olarak % total hiperisin miktarı %0,10 ile %0,30 arasında olmalıdır. 16 kez ayrı ayrı ekstraksiyon yapılarak liyofilize edilen kuru ekstrelerdeki total hiperisin miktarı UV spektrofotometrik analiz ile %0,19 ile %0,27 arasında tespit edilmiş, hiperisin içeriği açısından ayrı ayrı 16 kez hazırlanan ekstrelerin içerdiği ortalama total hiperisin miktarı %0,26 olarak tespit edilmiş ve farmakopede verilen sınır aralığında bulunmuştur. Ayrıca 16 liyofilize ekstrenin birleştirilmesiyle elde edilen karışımda, karışımın homojenliğini kontrol etmek için farklı noktalarından alınan üç numunenin analizi yapılmış, ortalama total hiperisin miktarı $0,21 \pm 0,00$ olarak tespit edilmiştir. Bu değer de farmakope sınırları içerisinde. Tüm bu sonuçlar ekstraksiyon sırasında kullanılan bitkinin farklı bölgelerinde farklı miktarda hiperisin tayin edilebileceğini, ancak standart sapmanın çok düşük olması ve farmakopede verilen sınırlar içinde olması da bu kuru ekstrelerin elde edilmesinde her üretimde farmakope sınırında kalılabildiğini göstermiştir. Bu sonuçlar alkollü *H.perforatum* ekstresinin soxhlet ekstraksiyon yöntemiyle başarılı bir şekilde hazırlanabildiğini kanıtlamıştır.

Liyofilize ekstrenin HPLC ile analizinde hiperisin ve psödohiperisin piklerinin yerini tam olarak tespit edebilmek için, hazırlanan metanollü ekstre çözeltisine sırasıyla hiperisin ve psödohiperisin standartlarının bilinen miktarları da eklenerek, ekstrenin HPLC kromatogramında piklerin kayma olmadan üst üste oturduğu ve psödohiperisin (Şekil 3.20.B) ve hiperisin (Şekil 3.20.C) eklenmesiyle, ilgili piklerin ilave edilen miktarla orantılı olarak aynı noktada pikin absorbans değerinin yükselmesini sağladığı belirlenmiş ve literatürle uyumlu ve standartlar ile aynı olacak şekilde kromatogramlar elde edildiği gösterilmiştir (Şekil 3.20.) (EP10, 2021). Ekstrenin HPLC piki ile standartların piklerinin örtüşmesi, standardize ekstrenin hazırlanabildiğini kanıtlamıştır.

Formülasyonda hiperisin liyofilize ekstre halinde bulunduğundan ve ortam seçimi için ön veri oluşturma açısından ekstrede çözünürlük çalışmaları gerçekleştirilmiştir. USP'ye göre (USP 44) farklı dengelenme sürelerinden sonra analiz edilen örnekler eşdeğer sonuçlar verdiğinde (örn., 24 saatte %5'ten az veya saatte %0,2'den az değişim) doygun çözünürlüğe ulaşılmış demektir.

Sürfaktan ve kosolvent kullanımının hiperisinin çözünürlüğüne etkisi incelendiğinde (Şekil 3.21.) 25 µg'dan 50 µg hiperisine eşdeğer liyofilize ekstre miktarındaki artışla birlikte tüm ortamlarda ekstrede çözünen hiperisin miktarında da bir artış gözlenmiştir. Bu da hiperisinin liyofilize ekstre halinde verilmesiyle, ekstrede bulunan diğer bileşenlerle kombinasyon halinde verilmenin hiperisinin çözünürlüğünü artırdığını göstermiştir. Hiperisin ekstre içerisinde diğer bileşenlerle kombine halde bulunmaktadır. Jurgeliemk ve Nahrstedt (2003)'ün çalışmasında da olduğu gibi hiperisin miktarı arttığında, diğer bileşenlerin de artmasıyla birlikte hiperisinin çözünürlüğünün arttığı tespit edilmiştir. 50 µg hiperisine eşdeğer ekstrede denge çözünme sonuçları etanol içeren PBS ortamı için 24. saatte dengeye ulaşmış ve ekstrenin maksimum çözünürlüğü bu ortamda $23,34 \mu\text{g/ml} \pm 1,39$ olarak belirlenmiştir. Şekil 3.21.B'de metanollü PBS ortamında 12.saatte maksimum çözünürlük $24,49 \mu\text{g/ml} \pm 1,52$ olarak etanollü ortama ($23,09 \mu\text{g/ml} \pm 0,27$) kıyasla daha yüksek bulunmasına rağmen 24.saatte çözünen hiperisin miktarındaki azalmanın fazla olması sebebiyle, hiperisinin etanollü PBS ortamında metanollü PBS ortamına göre daha uzun süre stabil kaldığını göstermiştir ve bu ortamda çalışma yapılmasına karar verilmiştir. Disch vd. (2017), fizyolojik pH aralığında (PBS (pH 6,8) ortamı) ekstrede hiperisin çözünürlüğünü $23,78 \mu\text{g/ml} \pm 0,98$ bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında elde edilen değerlerin literatürde verilen değerlere yakın olduğu tespit edilmiştir.

Ang vd. (2004)'ün yayınladıkları stabilite çalışmasında hiperisinin sulu çözeltilerde, asidik ortam koşullarında ve ışık maruziyeti altında stabil olmadıkları gösterilmiştir. Liyofilize bitki ekstresi ile yapılan çözünme çalışmasında, Şekil 3.21.'de görülen tüm ortamlarda (PBS (pH 7,4) ortamı, 0,2 h/h Tween 80 içeren PBS ortamı, %25 h/h metanol içeren PBS ortamı ve %25 h/h etanol içeren PBS ortamı) zamana bağlı olarak hiperisin miktarında azalma görülmektedir. Bu azalma, önceki çalışmalarda da bildirildiği gibi hiperisinin sulu ortamdaki instabilitesiyle açıklanabilir. Bunun dışında lipofilik özelliği sebebiyle hiperisin, fizyolojik pH'da ve tüm sulu ortamlarda agregre olma eğilimindedir (Fadel vd., 2010; Huygens vd., 2005a; Pereira vd., 2020). Bu da *in vitro* hiperisin salım çalışmaları yapılırken, kullanılan ortamlardan çok sık olmamak kaydıyla günde en az bir kez örnek alınmaz ve analiz edilmezse,

açığa çıkan hiperisinin bozunması nedeniyle formülasyondan hiperisinin %100'ünün geri kazanılamayacağını gösterir (Abouelmagd vd., 2015). Tez çalışmasında hiperisinin enkapsüle edilmesinin amaçlarından biri de bu instabilite problemidir. Yapılan çözünme çalışmaları sonucunda sink koşul için gereken limit konsantrasyon hesaplanarak çözünme ortamında 4,8 µg/ml hiperisine eşdeğer liyofilize ekstre olarak tespit edilmiştir.

Yapılan literatür araştırmaları sonucu nanopartiküllerin nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanabileceği düşünülmüş ve önformülasyon çalışmaları ile çeşitli formülasyon değişkenleri denemiştir. Formülasyonlarda PVA konsantrasyonu sabit tutulurken karıştırma hızı (10000 rpm'den 20000 rpm'e) değiştirilerek (ÖN1-ÖN5) ve orta karıştırma hızında sürfaktan konsantrasyonunda (%0,3'ten %0,9 a/h'e) değişiklik (ÖN3, ÖN6-7) yapılarak formüller hazırlanmış (Çizelge 2.3.) ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.15.). Polimerik partikülü oluşturan organik ve sulu fazların etkili bir şekilde karıştırılarak homojen bir emülsiyon elde edilebilmesi için, yeterli seviyede enerji sağlayan hızlı bir karıştırma gereklidir (Ibraheem vd., 2014). Formülasyonlarda (ÖN1-ÖN5) karıştırma hızı arttıkça, partikül boyutları azalmıştır (Çizelge 3.15. ve Şekil 3.22.). Partikül boyutunun küçülmesi, karıştırma hızının artmasıyla fazlar arasındaki mikro karıştırmanın (yani moleküler düzeyde karıştırma) yoğunlaşmasıyla açıklanabilir (Zhang vd., 2006). Yüksek hızlı karıştırma, kütle transferini ve fazlar arasındaki difüzyon oranını artırır, bu da kısa sürede fazların doymunluğuna neden olur ve dolayısıyla daha küçük partikülleri oluşturmak için hızlı çekirdeklenmeyi indükler. Partikül boyutu ölçümleri liyofilizasyon sonrası alınmış olduğu için Şekil 3.22.'de görülen bimodal dağılımların liyofilize partiküllerin tekrar homojen olarak dağıtılamadığını düşündürmektedir. Verileri burada sunulmamış olmasına karşın, liyofilizasyon öncesi de partiküllerin boyutu ölçülmüş ve çok daha küçük ve PDI değeri daha az olan partiküller elde edilmiştir. Ancak nihai ürün olarak liyofilize partiküller kullanılacağı için, liyofilizasyon sonrası partikül büyüklüğü değerlerinin kullanılması tercih edilmiştir. Ayrıca partiküllerin PDI değerlerinde orantılı bir değişim elde edilememiştir. Karıştırma hızı en yüksek olan ÖN5 formülasyonunun hem bu grup içinde en düşük ortalama partikül büyüklüğü hem de $0,44 \pm 0,10$ PDI değeriyle normal dağılım eğrisi elde edilebilen formül olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.15. ve Şekil 3.22.). PVA, emülsiyon oluşumunda stabilizer ajan olarak çeşitli çalışmalarda da kullanılmıştır (Geçgel, 2018; İlhan vd., 2022; Karatas vd., 2009, 2010). Kullanılan stabilizerin tipi ve konsantrasyonu, emülsiyonun oluşumunu ve stabilitesini etkileyebilir. Sürfaktan moleküllerinin varlığı, emülsiyon damlacıklarını stabilize eder ve bunların birbirleriyle birleşmesini önler (Budhian vd., 2007). Etkili bir stabilizasyon için sürfaktan moleküllerinin tüm organik faz-su arayüzey alanını kaplaması gerekir. Bu

nedenle daha küçük partikül boyutu ve dar boyut dağılımı elde etmek için minimum sayıda sürfaktan molekülü gerekir. Orta karıştırma hızında (15000 rpm), PVA konsantrasyonundaki artış (%0,3'ten (a/h)'dan %0,9'a (a/h)), partikül boyutunun $5278,00 \pm 395,00$ nm'den (ÖN3) $2947,00 \pm 417,00$ nm'ye (ÖN7) düşmesine neden olmuştur. Sürfaktan miktarı arttıkça, PDI değerlerinde azalma gözlenmiştir, bu da daha dar bir partikül büyüklüğü dağılımı (ÖN7) olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.15. ve Şekil 3.22.). PVA konsantrasyonu arttıkça sulu fazın artan viskozitesine bağlı olarak partikül boyutu azalmaktadır. Çünkü viskozite artışı, artan arayüzey stabilizasyonu nedeniyle partikül boyutunu küçültür (Budhian vd., 2007). Partiküllerin stabilitesini sağlamak için yüksek ZP (± 30 mV) gereklidir. Hem karıştırma hızındaki hem de PVA konsantrasyonundaki değişikliklerin partiküllerin ZP'sini önemli ölçüde etkilemediği ve tüm formülasyonlarda stabilitenin sağlandığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.15.). Tüm formülasyonlarda negatif ZP'nin gözlenmesi, formülasyonda kullanılan negatif yüklü PCL ve PVA'nın varlığıyla açıklanmaktadır. Tüm partiküllerde hem karıştırma hızındaki hem de yüzey aktif madde konsantrasyonundaki değişiklik %EE'yi (%Enkapsülasyon etkinliği) arttırmıştır (sırasıyla $78,22 \pm 4,16$ 'dan (ÖN1) $102,0 \pm 3,06$ 'ya (ÖN5) ve $86,38 \pm 0,76$ 'dan (ÖN3) $93,42 \pm 2,17$ 'ye (ÖN7)) (Çizelge 3.15.). Partiküllerden *in vitro* hiperisin salım hızı, partikül boyutuyla ters orantılı olarak artmıştır ve daha küçük partiküllerde daha yüksek salım gözlenmiştir (Şekil 3.23.-3.24.). Hem karıştırma hızındaki hem de sürfaktan konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak partikül boyutunun küçülmesi, *in vitro* hiperisin salım hızının artmasıyla sonuçlanmıştır. ÖN1-ÖN2 ve ÖN3 formülasyonlarında standart sapmaları da göz önünde bulundurulduğunda benzer partikül boyutlarında olmalarından dolayı salım hızı profilleri de benzerlik göstermiştir. Karıştırma hızının partikül boyutunun belirlenmesinde etkili olduğu, PVA konsantrasyonunun ise hem partikül boyutu hem de PDI üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca hem karıştırma hızındaki hem de yüzey aktif madde konsantrasyonundaki değişikliklerin, *in vitro* etkin madde salım hızının belirlenmesinde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir.

Homojenizatörle değişen hızlarda (10000-20000 rpm) karıştırılarak hazırlanan formülasyon (ÖN1-ÖN5) çalışmalarında partikül büyüklüğü 1000 nm'nin üzerinde (mikron boyutunda) bulunduğundan partikül büyüklüğünü küçültebilmek için formülasyonlarda karıştırma hızı sabit tutulurken ek karıştırma olarak prob sonikasyon uygulanarak formüller hazırlanmış (Çizelge 2.4.) ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.15.). Formülasyonlarda (ÖN8-9) ultraturrax ile karıştırmaya ek olarak prob sonikasyon uygulandığında, ÖN7 ve ÖN5 formülasyonlarına kıyasla partikül boyutları yaklaşık $3617,00 \pm 418,00$ nm'den $1532,00 \pm 167,00$ nm'ye düşmüştür (Çizelge 3.15.). Karıştırma hızındaki

değişim ile partiküllerin PDI değerlerinde bir küçülme gözlenmiş fakat partikül büyüklüğü dağılımları açısından unimodal dağılımdan uzaklaşarak multimodal dağılım gösteren partiküller elde edilebilmiştir (Çizelge 3.15. ve Şekil 3.22.). Bu durum homojenizatöre ek olarak sonikasyon uygulamasının formülasyonu oluşturan fazların karışımındaki ajitasyonun artırması ile açıklanabilir. Nanopresipitasyon yönteminde karıştırmanın genellikle mikro karıştırma (difüzyona bağlı karışma) ve mezo karıştırma (türbülanslı karışma) şeklinde uygulandığı görülmektedir (Tran vd., 2016). Partikül büyüklüğü dağılımı, mikro karıştırma ve mezo karıştırmanın dengesine bağlıdır. Örneğin, artan karıştırma hızı, hızlandırılmış mikro karıştırma nedeniyle daha küçük partiküller ile sonuçlanır. Oysa artan ajitasyon, yani türbülanslı karıştırma, fazlardaki doygunluğu azaltır ve sonunda daha büyük partiküller ile sonuçlanır. Ekstra prob sonikasyon uygulaması ile partiküllerin ZP'sini bir miktar düşürmesine rağmen ($-41,73 \pm 0,80$ mV'den $-21,70 \pm 2,08$ Mv'ye) önemli ölçüde etkilemediği ve tüm formülasyonlarda stabilitenin sağlandığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.15.). Partiküllerde homojenizatöre ek olarak prob sonikasyon uygulaması ile partikül büyüklüğündeki küçülmeye bağlı olarak %EE'de azalma gözlenmiştir. Etkin maddenin hızlı karıştırma ile polimerik partiküllerin hızla katılaşması sırasında polimerik yapı içine yeterince hapsolmesi mümkün olamamıştır. Daha yavaş karıştırma ile elde edilen daha büyük partiküllerde yükleme etkinliğinin artabildiği gözlenmiştir (Budhian vd., 2007). Partiküllerden hiperisinin *in vitro* salım, partikül büyüklüğüyle ters orantılı olarak artmıştır ve daha küçük partiküllerde daha yüksek hızla açığa çıktığı gözlenmiştir (48. saatte ÖN8 için $82,03 \pm 0,86$ ile ÖN9 için $88,01 \pm 0,76$ arasında değişen hiperisin salımı) (Şekil 3.25.). Ultraturrax ile karıştırmaya ek olarak prob sonikasyon ile partikül büyüklüğünün küçültülebilmesine yönelik çalışmada partikül büyüklüğü küçültülebilmiş fakat partikül büyüklüğü dağılımı açısından homojen dağılıma sahip partiküller elde edilemediği için prob sonikasyon uygulaması ile istenen sonuçlara ulaşılamayacağına karar verilmiştir.

Partikül büyüklüğünü küçültülebilmek için su fazı hacminde değişiklik yapılarak çalışmalara devam edilmiştir. Formülasyonlarda organik faz hacmi sabit tutulurken su fazı hacmi azaltılarak (organik faz: su fazı (h/h) 1:5'ten 1:2'ye) formüller hazırlanmış (Çizelge 2.5.) ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.15.). Formülasyonlarda (ÖN10-12) su fazı hacmi azaltıldığında, ÖN9 formülasyonuna kıyasla en küçük partikül büyüklüğüne 1:4 oranında (ÖN10) ulaşılmış ($580,90 \pm 3,81$ nm), 1:2 oranına inildiğinde (ÖN12) partikül büyüklüğü yeniden yükselmiştir ($1781,00 \pm 192,00$ nm) (Çizelge 3.15.). 1:4 oranında yaklaşık 500 nanometre boyutlarına ulaşılmasına rağmen partiküllerin PDI değerleri 0,70 seviyelerinde kalmış, ayrıca partikül büyüklüğü dağılımları açısından unimodal dağılımdan uzaklaşarak

bimodal dağılım görülmüştür (Şekil 3.22.). Bu durum damlacıkların koparak partikül oluşturmaya neden olan enerjinin sabit olması ve sulu faz hacminin azalmasına oranla sisteme uygulanan enerjinin artmasıyla açıklanabilir. Çünkü artık aynı miktarda enerji, daha küçük bir hacimde dağılmaktadır ve bu da daha fazla damlacık kopmasına ve daha küçük partiküllerin oluşumuna yol açar (Budhian vd., 2007). Su fazı hacminin değişmesine bağlı olarak partiküllerin ZP'si bir miktar artmış, buna rağmen önemli ölçüde ZP'yi etkilemediği ve tüm formülasyonlarda stabilitenin sağlandığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.15.). Bu değişim ayrıca su fazı ile daha az miktarda etkin madde etkileşimine bağlı olarak %EE'de artmaya (ÖN10; $80,38 \pm 0,06$ nm'den ÖN12; $89,50 \pm 0,02$ nm'ye) neden olmuştur. Partiküllerden *in vitro* hiperisin salım hızında, partikül büyüklüğündeki değişime rağmen partikül büyüklüklerindeki homojen olmayan dağılım sebebiyle bir farklılık elde edilememiştir (48. saatte organik faz: su fazı (h/h) 1:4'ten 1:2'ye sırasıyla $87,01 \pm 0,60$, $87,12 \pm 0,88$ ve $87,59 \pm 0,67$ hiperisin salımı) (Şekil 3.26.).

Önformülasyon çalışmalarında daha sonra organik faz hacmi sabit tutularak organik faz bileşenleri olan DCM:Etanol oranlarındaki değişimin (ÖN13-15) partikül karakterizasyonuna etkileri araştırılmıştır (Çizelge 2.6.). %EE'leri açısından değerlendirildiğinde DCM:Etanol oranındaki değişim %EE açısından değişime sebep olmamış, tüm oranlarda hazırlanan formülasyonlar için benzer etkin madde yüklemesi elde edilmiştir Çizelge 3.15. ve Şekil 3.22.'de de görüleceği gibi bu değişimle hazırlanan formülasyonlarda yine 1000 nm'nin üstünde ve bimodal dağılıma sahip partiküller elde edilmiştir. Çizelge 3.15.'te ÖN13-15 formülasyonlarının santrifüj öncesi partikül büyüklüğü ölçümleri de verilmiştir. Burada etanol artışı ile partikül büyüklüğünün düştüğü ($624,53 \pm 46,78$ nm'den (ÖN13) $202,00 \pm 1,44$ nm'ye (ÖN15) gözlenmiştir. Bu partiküllerde süspansiyon halinde iken unimodal dağılım gözlenebilirken liyofilize edildiğinde partiküllerde aglomerasiyon oluştuğu ve partikül büyüklüğünde artma tespit edilmiştir (Çizelge 3.15.-Şekil 3.22.). Bu nedenle bu formüllerde *in vitro* salım çalışması yapılmamış ve öncelikle partikül büyüklüğünün aglomerasiyonunu önlemeye yönelik çalışmalara devam edilmiştir. Partiküllerin kullanımını sınırlayan en büyük sorunlardan biri, uzun vadede sulu ortamda zayıf fiziksel ve kimyasal stabiliteye sahip olmalarıdır. Bu nedenle, nanopartikül toplanmasını (literatürde aglomerasiyon veya füzyon olarak da bilinir), nanopartikülleri oluşturan polimerin bozunmasını ve enkapsüle edilmiş etkin maddenin dışarı sızmasını önlemek amacıyla suyun sistemden uzaklaştırılması gerekir. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon), çözücünün uzaklaştırılmasını ve böylece katı bir toz elde edilmesini sağlayan ve özellikle PDI'leri açısından nanopartiküllerin yeterli stabilitesini garanti edebilen en sık kullanılan tekniklerden biridir. Ancak dondurarak kurutma genellikle nanopartiküller üzerinde

stres oluşturur ve dolayısıyla hem dondurma hem de kurutma aşamaları sırasında partiküllerin fiziksel stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilir (Zelenkova vd., 2014). Bu nedenle nanopartikülleri korumak için genellikle formülasyona çeşitli bileşikler (kriyoprotektanlar) eklenir. Yaptığımız literatür araştırmalarında glikoz, süktroz, trihaloz, mannitol, maltoz ve PVP gibi kriyoprotektanların kullanıldığı belirlenmiştir (Abdelwahed vd., 2006; Zelenkova vd., 2014). Tez çalışmasında ÖN13 formülasyonunda santrifüj aşamasının ardından süpernatantdan ayrılan partiküller, su ile yeniden disperse edilirken %2,5 ve %5 a/h konsantrasyonda mannitol ilave edilerek partiküller liyofilize edilmiş, ÖN16 ve ÖN17 formülasyonları hazırlanmıştır. ÖN13 formülasyonunun süspande haldeki partikül büyüklüğü $624,53 \pm 46,78$ nm iken, doğrudan liyofilize edildiğinde $1891,00 \pm 325,66$ nm, %2,5 a/h kriyoprotektan ilave edildiğinde $947,70 \pm 124,40$ nm (ÖN16), %5 a/h kriyoprotektan ilave edildiğinde ise $607,20 \pm 40,95$ nm (ÖN17) büyüklüğe ulaştığı tespit edilmiştir (Çizelge 3.15.). Kriyoprotektan kullanılmadan liyofilize edildiğinde büyüyen ve zor disperse olan partiküllerin, %2,5 ve %5 a/h mannitol ilave edildiğinde partikül büyümesinin engellenebildiği ve su ile redispersiyonunun kolaylaştığı belirlenmiştir. Ayrıca ZP'lerindeki benzerlik de partikül stabilitesinin korunduğunu göstermektedir. Partikül büyümesi açısından %5 a/h kriyoprotektan kullanımına karar verilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan ilavesi yapılmamıştır çünkü kriyoprotektanların sağladığı stabilizasyon seviyesinin konsantrasyonlarına bağlı olduğu ve yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektanların nanopartiküllerin stabilitesini olumsuz yönde etkileyebileceği rapor edilmiştir (Zelenkova vd., 2014). Kriyoprotektan içermeyen ÖN13 formülasyonunda %EE % $85,29 \pm 0,34$ iken, farklı oranda mannitol kullanılarak liyofilize edilen formülasyonlarda (ÖN16 ve ÖN17) bu değer %99-100'e yükselmiştir (Çizelge 3.15.).

Daha sonra ÖN14 ve ÖN15 formülasyonlarına %5 a/h mannitol kriyoprotektan olarak ilave edilip ÖN18 ve 19 formülasyonları hazırlanmıştır. Ayrıca organik faz hacmi 5 ml'den 10 ve 15 ml'ye çıkartılarak (Yağ fazı: su fazı hacmi değişimi 2:5 ve 3:5) ÖN20 ve ÖN21 formülasyonları ile polimer miktarı 50 mg ve 200 mg (polimer: liyofilize ekstre oranı değişimi 1:2 ve 2:1) kullanılarak ÖN22 ve ÖN23 formülasyonları hazırlanmıştır (Çizelge 2.7.). Çizelge 3.15.'te verilen sonuçlara göre DCM'nin organik fazdaki oranı artırıldığında, partiküllerin büyüklüğü ve polidispersitesi önemli ölçüde artmıştır (DCM:Etanol 1:4 (ÖN19) için $451,70 \pm 0,42$ nm, 1:1 (ÖN17) için $607,20 \pm 40,95$ nm ve 4:1 (ÖN18) için $580,80 \pm 90,36$ nm). Bu sonuç DCM'nin etanolden daha az polar olması sebebiyle organik faz damlacıklarının sulu faz boyunca dağılımını engellemesinden kaynaklanmaktadır (Chorny vd., 2002; Ribeiro vd., 2013). Ayrıca etanolün artırılması, organik çözeltideki PCL çözünürlüğünü azaltmış; bu da

sulu fazla temas halinde polimerin erken çökmesine ve birincil nanodamlacık merkezinden daha kısa bir mesafede polimerik bir duvarın oluşmasına neden olmuş ve böylece daha küçük partikül boyutu elde edilmiştir. Organik fazdaki etanol oranındaki artışa bağlı olarak (ÖN19) partikül büyüklüğünün küçülmesi, salımın artmasına neden olmuştur (Şekil 3.27.). Alternatif olarak, organik çözücülerin buharlaşma hızının artmasıyla (ÖN18) birlikte başlangıçtaki etkin madde salınım hızındaki artış, esas olarak partikül boyutundan ziyade polimerik matrisin artan gözenekliliği ile de ilişkili olabilir. DCM:etanol oranındaki değişimlerin partiküllerin ZP'sini önemli ölçüde etkilemediği ve tüm formülasyonlarda stabilitenin sağlandığı tespit edilmiştir.

Formülasyonlarda organik faz hacmi artırıldığında (ÖN20-21), partikül büyüklüğünde büyüme tespit edilmiş ve 15 ml organik faz oranı ile hazırlanan partiküllerde (ÖN21) partikül büyüklüğü yeniden $1045,00 \pm 67,24$ nm'ye yükselmiştir (Çizelge 3.15.). Buna ek olarak partiküllerin PDI değerleri 0,70 seviyelerinde kalmış, partikül büyüklüğü dağılımları açısından unimodal dağılımdan uzaklaşarak bimodal dağılım gösteren partiküller elde edilmiştir (Şekil 3.22.). Bu durum damlacıkların koparak partikül oluşturmaya neden olan enerjinin sabit olması ve sulu faz hacmine oranla organik faz hacmi artmasıyla açıklanabilir. Çünkü artık aynı miktarda enerji, daha büyük bir hacimde dağılmaktadır ve bu da daha az damlacık kopmasına ve daha büyük partiküllerin oluşumuna yol açar (Budhian vd., 2007). Organik faz hacminin değişmesine bağlı olarak partiküllerin ZP'si bir miktar artmış, ancak tüm formülasyonlarda stabilitenin sağlandığı tespit edilmiştir. Organik faz hacminin 5 ml'den (ÖN17) 10 ml (ÖN20) ve 15 ml (ÖN21)'ye yükseltilmesi organik faz buharlaşma sürecini uzattığı için etkin maddenin polimerde hapsolme derecesi de bir miktar azalmış ve 5 ml'de ÖN17 formülasyonunda % $99,37 \pm 0,21$ olan %EE, 15 ml organik faz kullanıldığında (ÖN21) % $92,27 \pm 0,12$ ye düşmüştür (Çizelge 3.15.). Organik faz hacmi artırıldığında partikül büyüğünün artmasına bağlı olarak *in vitro* hiperisin salım hızında da azalma gözlenmiştir (Şekil 3.28.).

Polimer- liyofilize ekstre oranı arttığında (ÖN23) partikül büyüklüğü ve PDI'de artış gözlenmiştir (Çizelge 3.15.). PCL miktarındaki azalma (ÖN22) ise partikül büyüklüğünde beklenmedik bir artışa yol açmıştır. Fakat standart sapmaları göz önünde bulundurulduğunda partikül büyüklüğünde önemli değişiklik elde edilemediği görülmüştür. Bu değişiklik, polimer miktarındaki değişim ve PVA'nın stabilize için yeterli gelmemesi, buna bağlı olarak da stabil olmayan partiküllerin agregasyonu ile açıklanabilir (Ibraheem vd., 2014). Partikül büyüklüğüne bağlı olarak *in vitro* hiperisin salım hızında da değişiklik sağlanamadığı gözlenmiştir (Şekil 3.29.).

ÖN19 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımında iyileşme elde edilebildiği için organik faz bileşeni DCM yerine hiperisinin çözünürlüğünün nispeten daha iyi olduğu aseton kullanılarak ön deneme yapılmıştır (Çizelge 2.8.). ÖN24-ÖN27 nanopartikül formülasyonlarında partiküllerin enkapsülasyon etkinliğinin 84.87 ± 0.09 ve daha yüksek olduğu bulunmuştur. PDI değerleri açısından bu formüllerin daha dar partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.15. ve Şekil 3.22.). Formülasyonlarda PCL miktarı artırıldığında (ÖN24-25 ve ÖN27) hem partikül büyüklüğü hem de %EE anlamlı şekilde artmıştır. Organik faz: su fazı hacmi oranındaki değişimde ise (ÖN25-26) hem partikül büyüklüğü hem de %EE açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. *In vitro* salım profilleri karşılaştırıldığında, formülasyonlarda PCL miktarı artırıldığında (ÖN24-25 ve ÖN 27) partikül büyüklüğü artışıyla ters orantılı olarak *in vitro* salımında da azalma tespit edilmiştir (Şekil 3.30.). Organik faz: su fazı hacmi oranındaki değişiminde ise (ÖN25-26) partikül büyüklüğü değişmediği için *in vitro* hiperisin salımında da farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.31.). Bu partiküller ile yola çıkılarak deneysel tasarım modellemesi yapılmış, karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve nihai optimum nanopartikül formülasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

Design-Expert yazılımı kullanılarak üç seviye ve üç tekrarla toplam yirmi yedi çalışma olarak tasarlanan ve üretilen nanopartikül DoE verilerinin (Çizelge 3.16.), CCD metoduyla elde edilen çoklu regresyon analizi sonuçları Çizelge 3.17.'de ve değişkenlere bağlı olarak elde edilen yanıtlara ait 3B RSM grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.32.).

DoE sonuçlarına göre nanopartiküllerin %EE (Y_1) verileri, regresyon analizi kullanılarak Y_1 yanıtını tahmin etmek için uygun doğrusal denklem, istatistiksel olarak önemli olmayan terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_1 = 91,59361 + 0,036063 * X_1 - 3,34794 * X_2$$

Eşitlik 4.1.

ANOVA sonuçlarına göre modelin F-değeri (165,0) oldukça yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,0001$) (Çizelge 3.17.). Tasarımda gerçekleştirilen 27 deney arasından en düşük %EE değeri %89,15, en yüksek %EE değeri %99,95 olarak elde edilmiştir. Hidrofobik piperinin nanopresipitasyon yöntemi ile PCL nanopartiküllere yüklenmesi sonucu %EE değeri $84,8 \pm 3,5$ olarak bildirilmiştir (Coco vd., 2023). Ancak bu tez çalışmasında aynı yöntem ve polimerle yine hidrofobik bir etkin madde olan *H.perforatum* ekstraktının nanopartikülleri hazırlandığında elde edilen daha yüksek %EE değerleri *H.perforatum* ekstresinin hidrofobik PCL zincirlerine yüksek afinitesi ile

açıklanabilir. Polimer konsantrasyonundaki artışın %EE'yi artırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.32.A ve Çizelge 3.17.). Polimer konsantrasyonunun etkisi, etkin maddenin organik çözeltideki çözünürlüğüne ve etkin madde-polimer etkileşimlerine bağlıdır. Yüksek konsantrasyonlu çözeltilerde, polimer sürekli fazın yüzeyinde hızla çöker ve etkin maddenin bu faz sınırını geçişini engeller. Ayrıca, konsantre polimer çözeltileri, yüksek viskoziteli bir ortam oluşturarak etkin maddenin polimerik partiküllerden salımını geciktirir. Bu durum, daha kalın bir polimer matris kaplamasıyla sonuçlanarak enkapsülasyonu sınırlar (Akmal Johari vd., 2024; Patel vd., 2022). Stabilizör olarak nanopartiküllerin dış yüzeyinde PVA varlığı, %EE'yi önemli ölçüde etkiler. Eşitlik 4.1.'de negatif katsayı PVA konsantrasyonunun artması %EE üzerinde negatif etkiyi açıklamaktadır. Kullanılan PVA miktarı arttıkça, nanoemülsiyonların viskozitesini yükseltir ve bu durum %EE'nin azalmasına neden olur (Akmal Johari vd., 2024). Ayrıca, Eşitlik 4.1.'de verilen katsayılar karşılaştırıldığında, PVA konsantrasyonuna ait katsayının PCL'nin katsayısından yüksek olması ($3,34794 > 0,036063$), PVA'nın %EE üzerindeki etkisinin polimer konsantrasyonundan daha fazla olduğu göstermiştir. Bu durum, Patel vd. (2022)'nin de ileri sürdüğü gibi yüksek yüzey aktif madde seviyelerinin iç fazdan dış faza hipersinin geçişini artırmasıyla açıklanabilir.

Partikül büyüklüğü (Y_2) ve PDI (Y_3)'yı tahmin etmek için uygun ikinci dereceden denklem, istatistiksel olarak önemsiz terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_2 = 346,04167 + 0,862800 * X_1 - 570,80556 * X_2 - 0,372000 * X_1X_2 \quad \text{Eşitlik 4.2.}$$

$$Y_3 = 0,660694 + 0,001193 * X_1 - 1,66806 * X_2 - 0,001800 * X_1X_2 \quad \text{Eşitlik 4.3.}$$

ANOVA sonuçlarına göre modellerin F-değerleri (Y_2 için 131,01 ve Y_3 için 55,13) oldukça yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı oldukları belirlenmiştir ($p < 0,0001$). En küçük partikül büyüklüğü 175,11 nm, en büyük partikül büyüklüğü ise 281,04 nm olarak elde edilmiştir. Literatürde partikül büyüklüğünün yaklaşık 200-300 nm aralığında olduğunda topikal uygulama için uygun olduğu belirtilmiştir (Coco vd., 2023). Bu açıdan elde edilen partikül büyüklüğü aralığının uygun olduğu düşünülmektedir. PDI, numunedeki partikül büyüklüğü dağılımının homojenliğini gösteren bir ölçüttür ve 0,5'ten düşük PDI değerleri dar büyüklük dağılımını ifade eder. Çalışmamızda en küçük PDI 0,03 ve en büyük PDI ise 0,35 olarak elde edilmiştir. Polimer miktarındaki artış partikül büyüklüğü ve PDI değerlerini artırmıştır (Şekil 3.32.B,C ve Çizelge 3.17.). Bu durum, polimer miktarının artmasıyla organik fazın viskozitesinin artmasına bağlanabilir. Yüksek polimer konsantrasyonu, nanopartiküllerin sulu çözeltide zayıf bir dağılım göstermesine ve daha homojen partikül dağılımlarına yol açar

(Bhattacharya, 2022; Diwan vd., 2021). PVA konsantrasyonu partikül büyüklüğü ve PDI değerlerini olumsuz etkiler. PVA, nanopartiküller ile dağılım ortamı arasındaki yüzey gerilimini azaltarak nanopartiküllerin koalesansını ve agregasyonunu önler. Ayrıca, PVA konsantrasyonunun partikül büyüklüğü ve PDI üzerinde polimer miktarına göre daha büyük bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Eşitlik 4.2. ve 4.3.). Partikül büyüklüğü, PVA konsantrasyonu ve PCL miktarı değişkenlerine bağlı olsa da, elde edilen sonuç bu iki faktörün birleşik etkisinden de önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu etkinin negatif olması, değişkenlerin etkileşiminin daha küçük boyutlu partiküllerin elde edilme olasılığını artırdığını göstermektedir. Bu durum, PVA konsantrasyonunun partikül büyüklüğünü azaltmada birincil faktör olduğunu, ancak PCL konsantrasyonunun da gerekli olduğunu bir kez daha doğrulamaktadır (Kasinathan vd., 2016).

ZP (Y_4) verileri regresyon analizi kullanılarak modellenmiştir. ZP'yi tahmin etmek için uygun ikinci dereceden denklem aşağıdaki gibidir:

$$Y_4 = 19,93014 + 0,033753 * X_1 - 79,56806 * X_2$$

Eşitlik 4.4.

Modelin F-değeri (23,97) oldukça yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,0001$) (Çizelge 3.17.). En küçük ZP -24,15 mV, en büyük ZP ise -5,33 mV elde edilmiştir. Tüm formülasyonlarda gözlenen negatif ZP, negatif yüklü PCL ve PVA'ya bağlanmaktadır (Diwan vd., 2021). Şekil 3.32.D ve Çizelge 3.17. incelendiğinde, PCL konsantrasyonundaki artışın, PCL'nin anyonik yapısı nedeniyle negatif ZP değerini artırdığını doğrulamıştır. Ayrıca, PVA konsantrasyonundaki artışın da negatif ZP değerini artırdığı gözlenmiştir (Bhattacharya, 2022). PVA gibi bir yüzey aktif madde, emülsiyon oluşumunda stabilize edici ajan olarak önemli bir rol oynar (Ilhan vd., 2022). Stabilizelerin türü ve konsantrasyonu, emülsiyonun oluşumu ve stabilitesini etkileyebilir. Sistem içindeki toplam yüzey alanı, daha küçük partiküllerin sayısının artmasıyla artar ve bu durum, yüzey aktif maddeyle kaplanan partikül sayısının artmasına bağlı olarak toplam yüzey aktif madde seviyesinin yükselmesine neden olur. Kullanılan yüzey aktif madde iyonikse, yüzey aktif maddenin türüne bağlı olarak ZP değerinde artış veya azalış gözlenebilir. Bu deneyde kullanılan PVA iyonik olmayan bir yüzey aktif maddedir (Kasinathan vd., 2016). Yüksek ZP (± 30 mV) partikül stabilitesi için gereklidir (Ilhan vd., 2022). Bilindiği gibi, nötr veya hafifçe yüklü nanopartikül dispersiyonları ($ZP \leq \pm 10$ mV) uzun süreli depolama sırasında koagülasyon, flokülasyon ve/veya aglomerasyon eğilimindedir (Ozturk vd., 2024). Ancak, bu aralık partikül büyüklüğü, konsantrasyon ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilir.

Hazırlanan formülasyonların bazılarında -10 mV'nin üzerinde ZP değerleri elde edilmesine rağmen çoğunlukla stabil formülasyonlar elde edilebilmiştir (Çizelge 3.16.).

CCD tasarım ile elde edilen nanopartiküllerin %LC (Y₅) verileri, regresyon analizi kullanılarak modellenmiş ve yanıtı tahmin etmek için oluşturulan uyarlanmış ikinci dereceden denklem, istatistiksel olarak anlamlı olmayan terimler göz ardı edilerek, uygun ikinci dereceden denklem aşağıdaki gibidir:

$$Y_5 = 8.03853 - 0.025397 * X_1$$

Eşitlik 4.5.

Yukarıdaki regresyon modeli, ANOVA analiz sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3.17.). Modelin F-değeri (115.02) oldukça yüksek ve p<0.0001 olarak belirlenmiştir. Tasarım kapsamında gerçekleştirilen 27 deneysel çalışma arasında, en düşük %LC %8,79 ve en yüksek %LC %11,75 bulunmuştur. Sonuç olarak, polimer konsantrasyonu arttıkça nanopartiküllerin %EE değeri yükselirken, %LC değerinde bir azalma gözlenmiştir (Şekil 3.32.E). Artan viskozite, nanopartiküllerdeki toplam PCL kütlesini artırarak, hiperisinin toplam nanopartikül kütlesine oranını azaltır ve bu durum %LC değerini düşürmektedir (Byun vd., 2011). %LC, nanotaşıyıcıların şekli, gözenekliliği, bileşimi ve partikül boyutuna bağlıdır (Ozturk vd., 2024). Genellikle, partikül büyüklüğü ve %LC arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. Bu durum, partikül büyüklüğündeki küçülmenin, etkin maddenin enkapsüle edilebileceği daha fazla alan oluşturduğunu ve dolayısıyla %LC değerini artırdığını göstermektedir. Dolayısıyla, artmış PCL miktarı ve azalmış PVA konsantrasyonu ile elde edilen daha büyük partikül büyüklüğü değerleri, etkin madde yükleme kapasitesinin azalmasına yol açmaktadır.

%Kümülatif AÇEM (48.sa) (Y₆) verileri, regresyon analizi kullanılarak modellenmiştir. Y₆'yı tahmin etmek için uygun ikinci dereceden denklem şu şekildedir:

$$Y_6 = 100,661 - 0,450931 * X_1 + 24,93297 * X_2$$

Eşitlik 4.6.

Modelin F-değeri (243,77) oldukça yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p<0,0001) (Çizelge 3.17.). En düşük kümülatif AÇEM %23,92, en yüksek kümülatif AÇEM ise %86,99 olarak elde edilmiştir. Şekil 3.32.F ve Çizelge 3.17.'da da görüldüğü gibi, PCL miktarının artırılması ve PVA konsantrasyonunun azaltılması, kümülatif açığa çıkan etkin madde miktarını azaltabilir. Partikül büyüklüğünün, etkin madde salımı üzerinde doğrudan bir etkisi bulunmaktadır. Partikül büyüklüğünün küçültülmesi,

nanopartiküllerin yüzey alanını artırarak etkin madde salım hızını artırabilir. PCL miktarının artırılması ve PVA konsantrasyonunun azaltılması, partikül büyüklüğünü artırarak, etkin maddenin geçmesi gereken yolu uzatmakta ve bu durum, kümülatif etkin madde salım miktarının azalmasına neden olmaktadır (Son vd., 2017).

Belirli faktör ve yanıtlar üzerinde elde edilen kısıtlamaların ardından, yazılım bağımsız değişkenler için birden fazla tahmin oranı oluşturmuştur. Optimizasyon, desirability fonksiyonunun sayısal analizi yoluyla gerçekleştirilmiş ve hedeflerin tanımlanmış bir aralıkta kalması sağlanırken belirlenen kısıtlamalara bağlı kalınmıştır. Liyofilize ekstre yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında, istenen parametreler arasında deneysel aralıkta %EE, 200-1000 nm arasında partikül büyüklüğü, 0,4'ün altında PDI, -10 mV'nin altında ZP yer alırken, %LC ve %AÇEM maksimum seviyeye çıkarılmıştır. Bu koşullar altında, istenirlik fonksiyonu 0,943 olarak elde edilmiştir. Design-Expert yazılımı, 62,5 mg PCL ve %1,00 (a/h) PVA konsantrasyonu içeren optimal deneysel parametreleri önermiştir (Şekil 3.33. ve Çizelge 3.18.). Çizelge 2.10.'da içeriği verilen bu formülasyon, optimum formülasyon olarak tanımlanmış ve detaylı karakterizasyon analizlerine tabi tutulmuştur. Gözlemlenen yanıt değerleri, tahminlerle büyük ölçüde uyum göstermiştir (Çizelge 3.18.). Bu bulgular, CCD yaklaşımının nanopartikül üretim sürecini etkili bir şekilde modellediğini, güvenilir tahminler ve başarılı optimizasyon sağladığını doğrulamaktadır (Beg vd., 2019; Haider vd., 2021).

Şekil 3.34. liyofilize *H.perforatum* ekstresinin, optimize edilmiş nanopartikül formülasyonuna kıyasla tüm örneklem zamanlarında anlamlı derecede daha yüksek bir kümülatif salım gösterdiğini ortaya koymaktadır. 24 saatlik bir süre sonunda ekstre için %98,55 ve optimize nanopartikül için %74,78'lik değerler elde edilmiştir. Optimize nanopartiküldeki azalmış %kümülatif AÇEM, PCL polimerinin enkapsülasyon özelliklerine bağlanabilir. PCL, hiperisin (Nafee vd., 2013), piperin (Coco vd., 2023), *Curcuma longa* (Kasinathan vd., 2016; Teixeira vd., 2022), silnidipin (Diwan vd., 2021), eksemestan (Kumar ve Sawant, 2013), kafein (Massella vd., 2018) ve silibinin (Patel vd., 2022) gibi bileşiklerle yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmış ve sürekli ve uzun süreli etkin madde salım profilleri elde etmek için potansiyel bir polimer olduğunu kanıtlamıştır. Nafee vd. (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, fotodinamik tedavi ve yara iyileştirme uygulamaları için hiperisin yüklü PCL-PEG nanopartikülleri incelenmiş; pH 7,4 PBS ortamında ilk 30 dakika içinde %22'lik bir başlangıç salımı, ardından 6. saatte %67'ye ve iki gün içerisinde %87'ye ulaşan kademeli bir salım rapor edilmiştir. Bu durum, 48 saate kadar süren sürekli bir salım sağlandığını göstermektedir. Benzer şekilde, Coco vd. (2023) tarafından terapötik

amaçlarla piperin yüklü PCL nanopartiküller geliştirilmiş ve saf piperinde benzer bir salım profili gözlemlenmiştir; ilk 8 saat içinde yaklaşık %12'lik bir piperin salımı ve dört günlük bir sürede %50'den daha az bir salım bildirilmiştir. Bu bulgular, PCL'nin hidrofobik ekstraktlar için uzun süreli salım profilleri sağlamada etkili bir taşıyıcı polimer olduğunu göstermektedir. PCL'nin hidrofobik özellikte olması nedeniyle yavaş biyobozunabilirliği, kontrollü salım davranışını daha da desteklemektedir. Etkin madde moleküllerinin çözünme ortamına difüze olabilmesi için, suyun hidrofobik PCL matriksine nüfuz etmesi gerekmektedir ve bu süreç doğal olarak gecikmelidir. Bu özellik, amorf bölgeden salım ortamına doğru olan ekstrakt hareketinin sınırlanmasıyla başlangıçtaki yüksek salım etkisini minimize etmektedir. İlerleyen aşamalarda, hiperisin salımı polimer erozyonu ve polimerik matriksten ekstrakt difüzyonu tarafından kontrol edilen daha yavaş bir hızda devam etmektedir. PCL'nin sulu ortamlardaki yavaş bozunma hızı göz önünde bulundurulduğunda, kontrollü ve sürekli etkin madde salımını mümkün kılmakta ve bu tür uygulamalar için ideal bir ilaç taşıyıcı olarak öne çıkmaktadır (Coco vd., 2023; Nafee vd., 2013; Pourhojat vd., 2016).

Altı farklı matematiksel model (sıfır derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer–Peppas, Hixson–Crowell ve Weibull) üzerinden hem optimize edilen ekstre yüklü nanopartikül formülasyonu hem de liyofilize ekstreden hiperisinin çözünme hızı kinetiği değerlendirilmiştir. Her bir modelin uyumu; DDSolver kullanılarak Çizelge 3.19.'da verildiği gibi R^2 (korelasyon katsayısı), AIC (Akaike Bilgi Kriteri), MSC (Model Seçim Kriteri) ve bazı model parametreleriyle karşılaştırılmıştır (Muhtadi vd., 2020). Optimize edilmiş nanopartikül formülasyonu ve liyofilize *H.perforatum* ekstresi için en yüksek determinasyon katsayısının (R^2) Weibull modeli ile elde edildiği görülmüştür (sırasıyla $R^2 = 0,9396$ ve $0,9660$). Bu durum, her iki sistemin salım davranışının Weibull modeline uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Weibull modeline ait en düşük AIC değerlerinin (26,4110) bu model için kaydedilmesi, modele yüksek derecede uyum gösterdiğini kanıtlamaktadır. Weibull modeli, literatürde polimerik matris tipi partiküllerin salım profillerini değerlendirmek için kullanılan modellerden biridir ve bu tez çalışmasında üretilen nanopartiküllerden hiperisinin açığa çıkabilmesi için salımda rol oynayan temel mekanizmalar, çözücülerin etkisi ve difüzyon tarafından kontrol edilmektedir (Estevinho vd., 2021). Korsmeyer-Peppas modeli de nanopartikül formülasyonu ($R^2 = 0,8174$) ve liyofilize ekstre ($R^2 = 0,7686$) için oldukça iyi bir uyum göstermiştir. Korsmeyer-Peppas modeli için elde edilen n değerleri sırasıyla 0,3674 ve 0,2855 bulunmuş olup, bu değerler Fick difüzyon mekanizmasına işaret etmektedir ($n < 0,45$) (Ahmady vd., 2022; Estevinho vd., 2021). Bu bulgu, hiperisinin salımında difüzyonun baskın bir rol oynadığını göstermektedir. Birinci derece kinetik model incelendiğinde, liyofilize

ekstre için yüksek bir R^2 değeri (0,9802) elde edilirken, nanopartikül formülasyonu için daha düşük bir R^2 (0,6831) değeri kaydedilmiştir. Bu durum, liyofilize ekstrede hiperisin salım mekanizmasının daha çok konsantrasyona bağlı olduğunu, nanopartikül formülasyonunda ise salımın daha karmaşık mekanizmalarla (örneğin, polimer matristen difüzyon ve erozyon kombinasyonu) gerçekleştiğini düşündürmektedir (Ahmady vd., 2022; Estevinho vd., 2021; Javaid vd., 2021). Sıfır derece, Higuchi ve Hixson-Crowell modelleri her iki sistem için de daha düşük R^2 ve yüksek AIC değerleri göstermiş, bu da bu modellerin salım profillerini yetersiz şekilde temsil ettiğini ortaya koymuştur. Her iki sistem için de salım verilerinin en iyi şekilde Weibull modeli ile tanımlandığı, nanopartikül formülasyonunda ise ayrıca Korsmeyer-Peppas modelinin difüzyon kontrollü salım mekanizmasını desteklediği düşünülebilir.

H.perforatum yüklü nanopartikül hazırlanmasının temel nedenlerinden biri hem hiperisinin sulu ortam sabilesini artırmak hem de deri gibi dış yüzeye uygulandığında ışık maruziyeti sebebiyle fotostabilite sorununu önlemektir. Fotostabilite çalışmalarında, hiperisin stabilitesinin ekstrakt formülasyonu ve optimize nanopartikül formülasyonu üzerinde karşılaştırılması yapılmıştır. Şekil 3.35.'te gösterildiği üzere, ekstrakt formülasyonunda güneş ışığına maruz bırakma sonrasında hiperisin miktarında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Özellikle, 7 gün süreyle gün ışığında bekletilen ekstrakt çözeltisinde hiperisin miktarı %65,01 seviyelerine kadar gerilemiştir. Optimize edilmiş nanopartikül formülasyonu ise, fotostabilite açısından üstün bir performans sergilemiştir. Nanopartikül formülasyonunda, güneş ışığına maruz kalma sonrasında dahi hiperisin miktarında anlamlı bir azalma gözlemlenmemiş; başlangıç hiperisin düzeyi büyük oranda korunmuştur. Kromatografik analizler de bu durumu desteklemiş ve ekstrakt ile nanopartikül formülasyonlarının ışık stabilitelerinde belirgin bir fark oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, farklı yapıda partikül çalışmalarında olduğu gibi (Galinari vd., 2022; Lima vd., 2013; Youssef vd., 2012), PCL içerisinde enkapsüle edilen hiperisinin, polimer yapısının sağladığı koruma etkisiyle fotodegradasyondan korunabildiği kanıtlanmıştır.

Nanopartikül formülasyonlarında polimer etkin madde etkileşimi tayini için liyofilize *H.perforatum* ekstresi, PCL polimeri, fiziksel karışım ve optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül formülasyonuna ait DSC termogramları incelenmiştir (Şekil 3.36.). *H.perforatum* ekstresine ait termogramda literatürle uyumlu şekilde karakteristik bir erime piki gözlenmezken, PCL polimerinin termogramında ise, karakteristik erime pikinin yaklaşık 60°C civarında olduğu ve bu değerlerin literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 3.36.B) (Pourhojat vd., 2016). Fiziksel karışımın termogramında (Şekil 3.36.C), hem liyofilize

ekstreden hem de PCL'den kaynaklanan piklerin korunarak izlendiği, ancak küçük kaymalar ve genlik değişimleri olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, liyofilize ekstreden ve polimerden gelen bileşikler arasında fiziksel bir karışım olduğunu, fakat kimyasal bir etkileşim veya kompleks oluşumu bulunmadığını göstermektedir. Optimize edilmiş nanopartikül formülasyonuna ait termogramda (Şekil 3.36.D) ise, ekstreden kaynaklanan karakteristik endotermik piklerin kaybolduğu veya belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Bu sonuç, hiperisin ve diğer aktif bileşenlerin PCL matrisi içerisinde başarılı şekilde enkapsüle edildiğini ve amorf yapıda olduğunu göstermektedir. Ayrıca, aktif maddelerin polimer matrisine moleküler düzeyde dağıldığı ve kristal yapının kaybolduğu da bu bulgularla desteklenmektedir. Bu bulgular, nanopartikül üretim sürecinin etkinliğini ve formülasyondaki bileşenler arasında iyi bir uyum sağlandığını göstermekte; stabil, homojen bir sistem elde edildiğini ortaya koymaktadır.

Optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül (A), boş PCL nanopartikül (B) ve liyofilize *H.perforatum* ekstresine (C) ait FTIR spektrumları (Şekil 3.37.) karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Liyofilize *H.perforatum* ekstresi, 3278cm^{-1} de OH grubuyla ilişkili geniş bir transmittans bandı göstermektedir. Yaklaşık 2916 ve 1278 cm^{-1} deki sinyaller sırasıyla C-H asimetrik gerilmeye ve CCO gerilmesine aittir. 1636 ve 1078 cm^{-1} de gözlenen zirveler sırasıyla C=O gerilmesine ve C-O gerilmesine ait olduğu düşünülmektedir. Boş PCL nanopartikül spektrumu, karbonil grubu C=O'ya bağlı 1723 cm^{-1} de güçlü bir karakteristik bant vermiştir. CH_2 'nin asimetrik ve simetrik gerilmesine bağlı, sırasıyla 2942 cm^{-1} ve 2866 cm^{-1} de iki titreşim bandı gözlenmiştir. Ayrıca, 1291 cm^{-1} deki bant, PCL'nin kristal fazdaki C-C ve C-O gerilmelerine atanırken, 1178 cm^{-1} ve 1163 cm^{-1} deki bantlar, sırasıyla amorf fazdaki simetrik C-O-C gerilmesi ve C-O, C-C gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada kaydedilen bu değerler literatürde verilen verilerle uyum sağlamaktadır (Mouro vd., 2021; Mutlu vd., 2022). Analizi yapılan liyofilize ekstre yüklü partikülün spektrumu hem PCL ($3000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ aralığında) hem de liyofilize ekstre ($3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ aralığında) ile ilgili absorpsiyon bantları için bantlar sergilemiştir. Bununla birlikte, liyofilize ekstre varlığında PCL ile arasında kimyasal etkileşim gösteren yeni bir bant oluşumu gözlenmemiştir. Fakat hidroksil ve karbonil gruplarına ait bölgelerde kaymalar ve bant genişlemeleri meydana gelmiştir. Bu değişiklikler, etkin maddenin polimer matrisine başarıyla enkapsüle edildiğini ve enkapsülasyonun fiziksel mekanizmalarla (adsorpsiyon veya matris içine dağılma) gerçekleştiğini desteklemektedir.

Çalışma sürecinde incelenen literatürlerden elde edilen bilgiler ışığında, 3B baskı ile en uygun film formülasyonunun geliştirilmesi için kullanılacak etkin madde ve polimerlerin özellikleri dikkate alınarak klasik çözücü dökme yöntemiyle, tamamıyla bir ön hazırlık olarak gerçekleştirilen çeşitli ön formülasyon çalışmalarına ait bulgular Çizelge 3.20.'de verilmiştir.

Öncelikle farklı molekül ağırlıklı kitozanların borik asitle birlikte hazırlanmasında borik asidin etkisini tespit etmek amacıyla borik asitli (ÖF2, ÖF4, ÖF6, ÖF8) ve borik asit içermeyen (ÖF1, ÖF3, ÖF5, ÖF7) formülasyonlar hazırlanmıştır (Çizelge 2.11.). Filmi oluşturan jelde ağırlıkça %3 a/h borik asit içeren formüllerde homojen film oluşumu gerçekleşmemiş, kristallenerek çökme meydana geldiği tespit edilmiştir (ÖF2, ÖF4, ÖF6, ÖF8). Elde edilen filmlerin kalınlık ölçümleri yapılmıştır. Çözücü dökme yöntemiyle hazırlanan film numunelerinin her birinin farklı bölgelerinden 1 cm x 1 cm boyutunda kesitler alınarak her kesit için mikrometre kullanılarak kalınlıkları ölçülmüştür. Kalınlık ölçümleri incelendiğinde gliserol ilavesinin (ÖF1'den ÖF3'e) film kalınlıklarında artışa neden olduğu görülmüştür (Çizelge 3.20.). Borik asit içeren film hazırlayabilmek için filmi oluşturan jelde ağırlıkça %3 a/h borik asit içerecek şekilde hazırlandığında formüllerde fazla borik asit olması nedeniyle kristallenerek çökmeye neden olduğu düşünülmüştür.

Bunun üzerine birim yüzey alanlı (1 cm x 1 cm) kuru filmin ağırlığına göre borik asit miktarı hesaplanarak kuru film ağırlığına göre %3 a/a borik asit içerecek şekilde denemelere devam edilmiştir. Kuruma süresini kısaltmak için plastizer oranı da düşürülmüştür (Çizelge 2.12.). Borik asit oranı birim yüzey alanına sahip kuru filmin ağırlığına göre hesaplanarak hazırlanan filmlerde (ÖF9-ÖF10), önceki film çalışmalarına kıyasla film oluşumunu engelleyici bir kristallenme ve çökme gözlenmemiştir. Elde edilen bu sonuç 3B baskı için borik asitin ilave şekline karar verilmesi açısından önemlidir. Hazırlanan filmlerde kalınlık tayini yapılmıştır. Gliserol oranı polimer ağırlığına göre yarısı oranında ilave edildiği için kalınlıkta da orantılı olarak azalma gözlenmiştir (Çizelge 3.20.). Hazırlanan çözeltinin reolojik özellikleri 3B baskı yapabilmeye önemlidir. Bu nedenle değişen polimer oranının çözelti viskozitesine etkisini gözlemlemek için sabit borik asit ve plastizer oranına karşılık, %1 a/h kitozan içeren formüllerin (ÖF9-ÖF10) yanı sıra, %3 (ÖF11, ÖF13) ve %5 a/h (ÖF12, ÖF14) oranlarında kitozan içeren film formülasyonları da hazırlanmıştır (Çizelge 2.13.). Literatürlerde 0,5-8 a/h oranlarında kitozan ile yapılmış 3B film çalışmaları yer almaktadır (Almeida vd., 2014; Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Hafezi vd., 2019; Q. H. Wu vd., 2017). Hazırlanmış olan film formülasyonlarının kurumaya bırakılmadan önce viskozite ölçümleri yapıldığında, kitozan oranı %5'e çıkarıldığında orta ve düşük molekül ağırlıklı kitozan

çözeltilerinde viskozitenin önemli oranda arttığı görülmüştür (LC için ÖF9'dan ÖF12'ye $9,98 \pm 0,03$ 'ten $28,10 \pm 0,10$ Pa.s'ye; MC için ÖF10'dan ÖF14'ye $9,93 \pm 0,40$ 'ten $37,10 \pm 0,10$ Pa.s'ye) (Çizelge 3.20.). %5 a/h oranında kitozan içeren formüller (ÖF12 ve ÖF14) çözücü dökme yöntemiyle dökülemeyecek kadar yüksek viskozitede olduğu için film dökümü yapılamamıştır. Ancak bu viskozitenin basınç destekli mikrosırınga tekniğiyle baskı alımına uygun olup olmadığı 3B baskı cihazında denenmiş ve bundan sonraki denemelere MC ile devam edilmiştir. 3B baskı sırasında oldukça viskoz olabilecek bu filmlerin hacimce dökümü ve dolayısıyla %yükleme etkinliği hesabı yapabilmeye karşılaşılabilecek zorluk sebebiyle filmlerin tüm içeriği ağırlıkça hazırlanmış ve ağırlıkça dökümü sağlanarak değerlendirilmiştir. Bunun için borik asit içeren (ÖF15), içermeyen (ÖF16), kitozan içerisine çözelti halinde borik asit ilave edilen (ÖF17) ve borik asit konsantrasyonu 2 katına çıkartılarak hazırlanan (ÖF18) %2 a/h oranında MC içeren film formülasyonları hazırlanmıştır (Çizelge 2.14.). Hazırlanan jellerden filmler başarı ile hazırlanabilmiş ve bundan sonraki aşamalarda ağırlık hesabına göre jellerin hazırlanmasına karar verilmiştir. Bu jellerin döküm öncesi viskoziteleri, kuruduktan sonraki kalınlıkları incelendiğinde, beklendiği üzere borik asit ilavesiyle filmlerin kalınlıklarında ve viskozitelerinde artış gözlenmiştir (Çizelge 3.20.). Bu aşamadan sonra değişen polimer oranının basılabilirliğe etkisini gözlemlemek için sabit borik asit ve plastizer oranına karşılık, %3, %4 ve %5 a/a (sırasıyla ÖF19-21) oranlarında MC içeren jel formülasyonları hazırlanmış (Çizelge 2.15.), baskı öncesi viskoziteleri belirlenmiş ve çeşitli baskı parametreleri ile baskı denemeleri yapılmıştır. $3,63 \pm 0,07$ Pa.s viskoziteli ÖF19 formülasyonunun, baskı yapılamayacak kadar düşük viskoziteli olduğu tespit edilmiştir. Ardından ÖF20 ve ÖF21 formülasyonu ile Çizelge 2.16.'da verilen farklı cihaz parametreleri ile ön baskı çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3B basılmış filmler incelendiğinde (Şekil 3.38. ve Çizelge 3.21.), desen doluluk oranının artırılmasıyla (R1-R3, R11-13, G4-6) baskı yapılan filmlerde ekstrüde edilen mürekkepler arasındaki boşluğun azaldığı tespit edilmiştir. Desen doluluk oranı belirlendikten sonra baskı alınacak yükseklik seçimi de baskı ucunun katman içinde yüzmesi veya katmana baskı yapamayacak kadar yüksekte olması nedenleriyle basılan filmin katmanlı yapısını etkilemektedir (R9-11). Bu yüzden optimum baskı yüksekliğinin belirlenmesi önemlidir. Rectilinear dolgu deseniyle ÖF20 formülasyonu ile yapılan baskı denemelerinde, en fazla katman sayısı R4 kodlu filmin baskı şartlarında elde edilebilmiştir. Ancak, baskı sonrası kuruyan filmin kalınlığı ölçüldüğünde ancak $30 \mu\text{m}$ 'ye ulaşılmıştır. En fazla kalınlığı ise R4'e göre baskı basıncı ve hızı artırılarak baskı alınan R7 kodlu film şartlarında elde edilebilmiştir. Fakat burada da en fazla 7 kat baskı alınabilmiş, son katta filmin katmanlı yapısında

bozulmalarla karşılaşmıştır. Rectilinear dolgu deseniyle ÖF21 formülasyonu ile yapılan baskı denemelerinde ise, polimer viskozitesindeki artış nedeniyle baskı için ihtiyaç duyulan basıncın da artırılması gerekmiştir. ÖF20 formülasyonuna kıyasla ($11,27 \pm 0,15$ Pa.s) ÖF21 formülasyonunda artan viskozite ($26,67 \pm 0,21$ Pa.s) katmanların birbiri üzerinde tutunmasını ve sertleşmesini hızlandırdığı için daha kalın filmler basılabilmektedir. 70 µm ve altındaki kalınlığa sahip filmler, baskı sonrası yüzeyden çıkarılırken çoğunlukla parçalanma gözlenmiştir (R5, R11). Bu açıdan değerlendirildiğinde, henüz Grid ve Aligned rectilinear dolgu desenleriyle daha kalın filmlerin baskı alınabileceği parametreler bulunamamıştır. Bu parametreler arasında en yüksek kalınlık Rectilinear dolgu deseniyle %5 a/a MC'li jellerle (ÖF21) elde edilebilmiştir. Baskı çalışmaları sırasında AxoSuite yazılımının kendi arayüzü kullanılırken, istenilen katman sayısı basıldığında baskıyı bitirme ve katmanların bir miktar sertleşmesi için katmanlar arasında bekleme gibi özelliklerin çok aktif çalışmadığı tespit edilmiştir. Bu durumu geliştirmek için Gcode komutları düzenlenerek cihazın istediğimiz şekil ve boyuttaki filmleri istediğimiz parametrelerde baskı alması sağlanmıştır. Yapılan tüm denemelerde, Rectilinear dolgu deseni, %40 desen doluluk oranı, 0,15 mm katman yüksekliği, 9 mm/s nozül baskı hızı ve 10 psi baskı basıncı parametreleri ile 25G konik tip baskı ucu kullanılarak %5 a/a MC'li jel (ÖF21) ile homojen görünümlü ve en yüksek kalınlığa sahip film (R13) elde edilebilmiştir (Çizelge 3.21. ve Şekil 3.38.R13). Bu filmin parametrelerini içeren Gcode komutları düzenlenerek (.gcode) dosya formatı oluşturulmuştur.

Elde edilen bu sonuçlara göre %5 a/a MC içeren formüllerde farklı plastizer kullanımı, plastizer oranı ve etkin madde miktarı parametrelerinde değişiklikler yapılarak (25 Gauge konik tip baskı ucu, 9 mm/s baskı hızı, %40 infill density, 10-50 psi baskı basıncı) yeni formülasyonlar hazırlanmış (F1-F10) (Çizelge 2.17.) ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Plastizer olarak PEG, gliserol ve PG ile çalışma yapılmıştır. Formülasyon içeriklerindeki değişimle elde edilen farklı viskozitelere sahip F1'den F9'a kadar olan formülasyonlar, 3B baskı yöntemi kullanılarak başarıyla basılabilmektedir. F10 formülasyonu yüksek viskozitesi nedeniyle basılamamıştır (Çizelge 3.22.). Hazırlanan filmlerde yükleme etkinliği %80 ve üzerinde bulunmuştur (Çizelge 3.22.).

PG (F1) ve PEG (F2) ile hazırlanan filmler gliserol (F3) içeren filme göre daha yüksek viskozite sergilerken, ortalama film kalınlığında önemli bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 3.22.). Formülasyonda PG kullanımı, film adezyonunda küçük bir azalma ile sonuçlanmıştır (Çizelge 3.23.). Gliserol içeren filmde (F3), filmlerin mekanik direnci ($31,99 \pm 9,09$ MPa) ve adezyonu ($2,796 \pm 0,04$ N) diğer plastizerlerin kullanıldığı formülasyonlara

göre nispeten daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.23.). En yüksek şişme ($2305 \pm 192,5$) en hidrofilik plastizer olan PEG içeren filmde (F2) gözlenirken, en düşük şişme oranı ($1267 \pm 116,4$) daha az hidrofilik olan PG içeren filmde (F1) gözlenmiştir. Yüksek oranda hidrofilik PEG içeren filmlerde, şişme sırasında parçalanma gözlenmiştir (Şekil 3.40.'ta sonuçları verilmemiştir). Şişme sırasında parçalanarak film bütünlüğünün kolayca bozulması gerekçesi ile PEG, viskozite ve baskı sonrası gerilme direnci ile adezyon açısından değerlendirildiğinde de PG içeren filmlerle devam edilemeyeceğine karar verilmiştir.

Hidrojellerin viskozitesi, gliserol içeriğinin ağırlıkça %10'dan %75'e artmasıyla artmıştır (F3-F6) (Çizelge 3.22.). Film içeriğinin artmasıyla filmin kalınlığı da artmıştır. Bununla birlikte, plastizer içeriğindeki artış, filmlerin su absorpsiyon kapasitesini (Şekil 3.40.), mukavemetini ve adezyon özelliklerini (Çizelge 3.23.) azaltmıştır. Bu sonuçlar, gliserolün klasik plastizer etkisiyle kitozan matrisine nüfuz ederek moleküller arası etkileşimleri ve polimer hareketliliğini azalttığını göstermektedir (Thakhiew vd., 2010). Sabit oranda gliserol ile filmlerdeki borik asit miktarının dokuz kat artması (F10), viskozitede önemli bir artışa neden olmuş, dolayısıyla basılamamıştır (Çizelge 3.22.). Filmlerde borik asit miktarının artması (10 mg'dan 60 mg'a) (F4, F7-F9) adezyonu etkilemezken, mekanik dirençte azalmaya ($18,29 \text{ MPa} \pm 4.61$ 'den $8,140 \text{ MPa} \pm 1.78$ 'e) yol açmıştır (Çizelge 3.23.). Ayrıca, filmlerde borik asit miktarının üç kata kadar artması (F4, F7-F8), şişme oranında azalmaya yol açmıştır ve bu durumun borik asit ve kitozan arasındaki çapraz bağlanma ile açıklanabileceği düşünülmüştür (Şekil 3.40.). Artan çapraz bağlanma, polimer zincirlerinin hareketini kısıtladığı için şişme derecesini de düşürmektedir (Wong vd., 2015). Ek olarak, borik asit miktarının altı kat artması (F9), şişme oranında daha yüksek bir artışa neden olmuştur; bu da önceki filmlere kıyasla daha yüksek çapraz bağlanma oranına bağlanan daha kırılğan bir yapı ile açıklanabilir. Çapraz bağlanma derecesindeki artış belli bir sınırın üstüne çıktığında polimer yapının sertleşmesi ve kuruyan filmlerde gevrek bir yapının oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Liang vd., 2019). Bu çalışma sonucunda borik asit miktarının 60 mg'a kadar çıkarılmaması kararı alınmıştır. Farklı konsantrasyonlarda borik asit ilavesi ile filmlerin yapısal özelliklerinde gözlenen değişiklikler borik asit ve kitozan arasında çapraz bağlanma olasılığını göstermektedir. Aslında etkin maddelerin salım mekanizması şişme oranına bağlıdır (Gull vd., 2019). Filmler PBS ortamı ile temas ettiğinde suyu absorblamaya başlar ve bu şişme oranı belirli bir süreye kadar devam eder. Daha sonra şişme hızının azalması, yüksek çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun kitozan zincirleri ile kompakt bir ağ geliştirerek hareketini kısıtlamasından kaynaklanmaktadır, böylece artan miktardaki çapraz bağlayıcı, suyun daha sıkı çapraz bağlı ağ nedeniyle emilmesini engeller.

Bu formülasyonlara kadar 25G konik tip (ucuna doğru daralarak sivrilen yapıda; Şekil 1.5.C) baskı ucu kullanılarak baskı yapılmıştır (F1-F10), fakat hem 7 katın üstünde baskı alınamadığı ve yara bölgesine uygulamada kullanılmak üzere daha kalın dokuların da hazırlanması gerekebileceği için, hem de baskı sonrası üst üste gelen tabakaların sabit bir alanda kalamayıp yayılımları fazla olduğu için homojen görünümlü filmler elde edilememesi nedeniyle F4 formülasyonundaki etkin madde oranları değiştirilerek 25G blunt tip (ucu düz kesilmiş, silindirik ve sivri olmayan; Şekil 1.5.C) baskı ucu ile de denemeler yapılmıştır (borik asit içermeyen (F11) ve 10 mg (F12), 30 mg (F13) ve 60 mg borik asit (F14), hepsinde %25'er gliserol ve 20 g %1,5 (h/h) asetik asit içeren formüller 9 mm/s baskı hızı, %40 infill density, 10-50 psi baskı basıncı ile hazırlanmıştır) (Çizelge 2.18.). Aynı formülasyon içeriği ile konik tip baskı ucu (F4, F9) ve blunt tip baskı ucu (F12-F14) kullanılarak baskı alınan formülasyonların görselleri Şekil 3.39.'da yer almaktadır. Konik tip baskı ucuna kıyasla (F4 ve F9) blunt tip ile baskı alınan filmlerde (F12 ve F14) daha homojen jel dağılımı sağlandığı için daha homojen filmler elde edilebilmiştir. Sabit oranda gliserol ile 25G blunt tip baskı ucu ile 10 kat baskı yapılan filmlerdeki borik asit miktarının artması (F11-14), viskozitede artışa neden olmuştur (Çizelge 3.22.). Filmlerde borik asit miktarının (10 mg'dan 60 mg'a) artması (F12-14) adezyon kuvvetini artırırken, mekanik dirençte azalmaya (F14 için $14.86 \text{ N} \pm 3,35$) yol açmıştır (Çizelge 3.23.). Ayrıca, filmlerde boş kitozan filme (F11) kıyasla (5 dk. da 130.79 ± 14.54), 10 mg borik asit içeren filmde (F12) daha düşük şişme oranı (5.dk.da 112.28 ± 16.51) tespit edilmesi kitozan ile borik asit arasında bir çapraz bağlanma olabileceğini göstermiş (Şekil 3.41.), 6 kat kadar borik asit ilave edildiğinde (F14) borik asit ve kitozan arasındaki aşırı çapraz bağlanma sonucu yapının kırılması ile şişme oranında artışa (5.dk. da 228.03 ± 2.97) yol açmıştır (Şekil 3.41.).

Konik tip baskı ucu ile hazırlanan F4 ve F9 formülasyonlarına kıyasla (Çizelge 2.17.) blunt tip ile basılmış (F12 ve F14) (Çizelge 2.18.) filmlerde daha homojen jel dağılımı sağlandığı için daha homojen filmler elde edilebilmiştir. Fakat bu baskı ile film katmanları çok belirgin olamamıştır. Bunun üzerine F12 formülasyonunu oluşturan jel kullanılarak gcode düzenlemesi ile katmanlar arasına bekleme süresi ayarlanmış ve denemeler yapılmıştır (10 mg borik asit, %5 kitozan, %25 gliserol, 9 mm/s baskı hızı, %40 infill density, 10-50 psi baskı basıncı) (Çizelge 2.19.). Şekil 3.39.'da görüleceği üzere bu yöntemle filmlerde istenilen katmanlı görünüm elde edilebilmiş (F15), 10 kat ve 20 kat (F15 ve F16) baskı alınarak filmlerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Katmanlar arasına bekleme süresi koyularak 25G blunt tip baskı ucu ile 10 kat ve 20 kat baskı yapılan bu filmlerde bekleme olmaksızın baskı alınan filme (F12) kıyasla filmlerin kalınlığında artma tespit edilmiştir (55,83

$\pm 8,01 \mu\text{m}$ 'den $255,0 \pm 8,37 \mu\text{m}$ 'ye) (Çizelge 3.22.). Katmanlar arasında ek kuruma süresi verilmesi, katmanların birbiri üzerinde tutunmasını ve sertleşmesini hızlandırdığı için daha kalın filmler basılabilmektedir. Ayrıca 20 kat baskı alındığında kalınlığın da yaklaşık 2 kat artarak $255,0 \mu\text{m} \pm 8,37$ 'ye ulaştığı görülmüştür. % yükleme etkinliği açısından önemli fark gözlenmezken (Çizelge 3.22.) hem adezyonlarında hem de gerilme dirençlerinde azalma meydana gelmiştir (Çizelge 3.23.). Bu durum katmanlar arasında ek kuruma süresi verilmesi ile, hızlı bir şekilde katmanların birbiri üzerine yayılmasının önlenmesi ve artan porlu yapı ile birlikte filmin içeriğindeki suyun buharlaşarak kurummasının, yüzey alanını arttırması sonucu daha kuru ve sert filmlerin oluşması ile açıklanabilir. Yani daha kuru oldukları için filmlerin (F15-16) mekanik dirençleri ve adezyonları da azalmıştır. Ancak F15'e kıyasla 20 kat baskı alınan F16 formülasyon içeriğinde mekanik direnç ve adezyonu sağlayacak daha fazla bileşenin olması nedeniyle hem adezyonun hem de gerilme direncinin artması ile sonuçlanmıştır. Borik asitin filmlerden açığa çıkış profilleri ve filmlerin şişme özellikleri incelendiğinde, en düşük şişme özelliği sergileyen filmde bile şişme derecesi %100'ün üzerinde olduğu için etkin madde salım hızında farklılık elde edilememiştir (Şekil 3.42. ve 3.44.). Borik asitin hidrofilikliği nedeniyle, tüm profillerde ani bir açığa çıkış (burst) ve ardından salımında azalma gözlenmiştir. Katman sayısı fazla olan formülasyonun (F16) 10 katmanlı formülasyona (F15) kıyasla içeriğinde nispeten daha fazla oranda kitozan olmasından dolayı daha fazla oranda sıvı absorbladığı görülmektedir (Şekil 3.42.).

Bu çalışmanın ardından %5 a/a MC içeren formüllerde plastizer oranı sabit tutulmuş (Gliserol %25 a/a), AxoSuit yazılımına ait farklı desen ve etkin madde miktarı parametrelerinde değişiklikler yapılarak (25G blunt tip baskı ucu, 9 mm/s baskı hızı, %40 infill density, 10-50 psi baskı basıncı) farklı desenlerde yeni formülasyonlar hazırlanmış (F15, F17-20) (Çizelge 2.20. ve 2.21.), karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.22-3.23.). Aligned rectilinear desen kullanılarak hazırlanan formülasyon (F17) uygun mekanik dirence sahip olmadığı için baskı sonrasında dayanıklı filmler elde edilememiştir. En kalın filmler honeycomb ve grid desen ile 3B basımda elde edilirken (F19-F20 $310,00 \pm 12,25 \mu\text{m}$ - $293,33 \pm 8,16 \mu\text{m}$) en ince kalınlığa sahip filmler ise Aligned Rectilinear desen ile basımda (F17) elde edilmiştir çünkü baskı sonrasında zeminden homojen şekilde çıkarılamamıştır (Çizelge 3.22.). Yükleme etkinliklerinin genel olarak tüm filmlerde %85'in üzerinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.22.). Desen değişimine bağlı olarak filmlerin şişme oranlarında farklılıklar tespit edilmiştir (Şekil 3.42. ve 3.43.). Özellikle en yüksek kalınlığa sahip grid desenli (F19) ve honeycomb desenli (F20) filmlerde 1 saate kadar maksimum şişme gözlenmiştir. Özellikle düşük şişme özellikleri nedeniyle rectilinear

desene alternatif olarak farklı desenlerle film baskısı alınmasının etkisi net bir şekilde görülmektedir. Filmlerde desen değişimine bağlı olarak adezyon kuvvetinde de farklılıklar tespit edilmiştir (Çizelge 3.23.). Bu farklılık, filmin desenine bağlı olarak biyoadeziv yüzey ile filmin temas yüzeyinin değişimi ile ilişkilendirilebilir. En düşük adezyon rectilinear (F15) ve triangular (F18) desenli filmlerde gözlenmiştir (sırasıyla $0,373 \pm 0,10$ N ve $0,305 \pm 0,06$ N). En yüksek adezyon ise honeycomb (F20) ve grid (F19) desen ile basılmış filmlerde gözlenmiştir (sırasıyla $0,560 \pm 0,11$ N ve $0,771 \pm 0,21$ N). Mekanik direnç açısından kalınlığı en yüksek olan honeycomb (F20) ve grid (F22) desenli filmlerin yüksek mekanik dirence sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.23.). 3B baskı ile hazırlanan filmlerde desen değişimine bağlı olarak filmlerin mekanik özelliklerinde değişiklik elde edilebildiği bulunmuştur (Abdella vd., 2022). Borik asitin etkin madde salım profilleri ve filmlerin şişme özellikleri incelendiğinde (Şekil 3.44. ve 3.45.), ilk 5 dakikada görülen yüksek oranda şişmeye bağlı olarak ilk 5 dakikada %80'lere ulaşan salım ile sonuçların paralellik gösterdiği görülmüştür. Genel olarak yüksek şişme oranına sahip filmlerde borik asitin hidrofilikliği nedeniyle, tüm profillerde ani bir açığa çıkış (burst) ve ardından salımında azalma gözlenmiştir. Fakat filmlerin mekanik özelliklerinden farklı olarak farklı dolgu desenlerine sahip 3B filmlerde, borik asitin salım oranında bir fark bulunamamıştır. Literatürde şişebilen sistemler için gözenek geometrisinin rolünün önemsiz olduğu, etkin madde salım hızının belirlenmesinde yardımcı maddeler de dahil olmak üzere diğer faktörlerin de rolünün olduğu ve bu nedenle genel bir sonuca varmanın zor olacağı ifade edilmektedir (Abdella vd., 2022).

Design-Expert yazılımı kullanılarak üç seviye ve üç tekrarlı (Çizelge 2.22.) toplam yirmi yedi çalışma olarak tasarlanan ve üretilen 3B basılmış film çalışmasına ait DoE verilerinin (Çizelge 3.24.), CCD metoduyla elde edilen çoklu regresyon analizi sonuçları Çizelge 3.25.'te ve değişkenlere bağlı olarak elde edilen yanıtlara ait 3B RSM grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.46.).

DoE sonuçlarına göre filmlerin kalınlık (Y_1) verileri, regresyon analizi kullanılarak Y_1 yanıtını tahmin etmek için uygun doğrusal denklem, istatistiksel olarak önemsiz terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_1 = 303,337 + 57,0783 * X_1 + 3,69383 * X_2 - 102,915 * X_1^2$$

Eşitlik 4.7.

Şekil 3.46.A ve Çizelge 3.25.'te verilen film çalışmalarının DoE sonuçlarına göre filmlerin kalınlık (Y_1) değişkeninin ölçüm değerleri 187 μ m ile 445 μ m arasında değişmektedir. En kalın filmler, grid ve honeycomb desenli filmlerden elde edilmiştir.

Deneysel veriler, istatistiksel olarak anlamlı bir p-değeri ($p<0.0001$) ile quadratik bir modele uyum sağlamış ve bu etki 3B grafik ile görselleştirilmiştir. Bağımsız değişkenlerin Y_1 çıktısı üzerindeki etkileri, X_1 ve X_2 değişkenlerinin (sırasıyla desen ve borik asit miktarı) katsayılarının pozitif işaretlerinden anlaşılabilir ve bu pozitif etki, bağımsız değişkenler X_1 ve X_2 'nin -1 seviyesinden +1 seviyesine geçişinin, Y_1 yanıtındaki artışa etkisi anlamlıdır ($p<0.05$). Değerlendirilen tüm bağımsız değişkenler arasında, faktör katsayılarından da görülebileceği gibi, filmlerdeki desen triangular, grid ve honeycomb sıralamasına göre değiştiğinde, filmlerin desenini değişimi filmlerin kalınlığı üzerinde en yüksek etkiye sahiptir ve triangulardan honeycomba filmlerin kalınlığında artışa neden olmuştur. Abdella vd. (2022)'nin yaptığı çalışmanın aksine, desen değişimi (X_1), filmlerin kalınlıklarında değişimlere yol açmıştır. Bu farklı sonuç, formülasyondaki borik asit miktarındaki artış da film kalınlığındaki artışa dolaylı olarak katkıda bulunmasıyla açıklanabilir.

DoE sonuçlarına göre filmlerin %EE (Y_2) verileri, regresyon analizi kullanılarak Y_2 yanıtını tahmin etmek için uygun doğrusal denklem, istatistiksel olarak önemsiz terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_2 = 84,47 + 0,28777 * X_2$$

Eşitlik 4.8.

Filmlerdeki %EE, %83,09 ile %101,69 aralığında bulunmuştur. Bağımsız değişkenlerin %EE üzerindeki etkileri, 3B grafik ve doğrusal denklem ile gösterilmiştir (Şekil 3.46.B ve Çizelge 3.25.). Deneysel veriler, doğrusal bir modele uyum sağlamış, ancak model için elde edilen p-değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,0639$). Ayrıca, Y_2 için yeterli hassasiyet değeri, istenen değer olan 4'ten küçük bulunmuştur ve bu durum, modelin tasarım alanı içindeki verileri açıklama, yönlendirme ve tahmin etme yeterliliğine sahip olmadığını göstermektedir.

DoE sonuçlarına göre filmlerin adezyon kuvveti (Y_3) verileri, regresyon analizi kullanılarak Y_3 yanıtını tahmin etmek için uygun doğrusal denklem, istatistiksel olarak önemsiz terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_3 = 0,388693 + 0,282417 * X_1 + 0,0186183 * X_2$$

Eşitlik 4.9.

Y_3 yanıtına ait ölçümler 0,24 N ile 1,33 N arasında bulunmuştur. En yüksek adezyon, honeycomb desenli filmlerde gözlenmiştir. Deneysel veriler doğrusal modele uyum sağlamış ve modelin p-değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$). Bu etki, 3B grafik ve

doğrusal denklem ile gösterilmiştir (Şekil 3.46.C ve Çizelge 3.25.). Bu yanıtta, X_1 ($p<0,0001$) ve X_2 ($p=0,0010$) anlamlı model terimleri olarak belirlenmiştir. Her iki faktörün de (X_1 ve X_2) Y_3 üzerinde pozitif bir etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu pozitif etki, X_1 ve X_2 giriş değişkenlerinin -1 seviyesinden +1 seviyesine değişiminin Y_3 çıktısını anlamlı derecede artırdığını göstermektedir ($p<0,05$). Faktör katsayısı, desen değişiminin filmlerin adezyonu üzerinde en büyük etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, desen değişiminin etkisiyle açıklanabilir; desen değişimi simüle edilmiş müsin yüzeyiyle daha etkileşime neden olan hidrojen bağı oluşumu, adezyonu artırmaktadır (Boateng vd., 2023). Tavuk deri dokusu kullanılarak yapılan bir çalışmada, kitozan filmlerin biyoadезyon değerleri $0,47 \text{ N} \pm 0,03$ ile $0,79 \text{ N} \pm 0,01$ arasında bulunmuştur (Khan vd., 2000). Bu anlamda, 10 mg borik asit içeren triangular desenli filmler hariç tüm filmler çok yüksek adezyon sergilemiştir. Adezyon değerleri, film kalınlığı ile pozitif bir korelasyon göstermektedir ($p<0,05$) ve faktörlerdeki değişikliklere bağlı olarak farklılık gösteren kalınlık verileri, adezyonu da pozitif yönde etkilemiştir. Bu durum, substrat ile temas halinde olan bir filmin kalınlığının, moleküllerin etkili olabileceği etkileşim mesafesinden daha az olmasıyla açıklanabilir (Peng ve Chen, 2011). Arayüzey adezyon kuvvetleri, belirli bir film kalınlığına ulaşıncaya kadar film kalınlığının artmasıyla asimptotik olarak artmaktadır.

DoE sonuçlarına göre filmlerin mekanik direnci (Y_4) verileri, regresyon analizi kullanılarak Y_4 yanıtını tahmin etmek için uygun doğrusal denklem, istatistiksel olarak önemsiz terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_4 = 2,51001 + 2,40737 * X_1 + 0,273678 * X_2$$

Eşitlik 4.10.

Y_4 yanıtına ait sonuçlar 2,29 MPa ile 15,46 MPa arasında bulunmuştur. En yüksek mekanik direnç, honeycomb desenli filmlerde gözlenmiştir. Deneysel veriler doğrusal modele uyum sağlamış ve modelin p-değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$). Bu etki, 3B grafik ve doğrusal denklem ile gösterilmiştir (Şekil 3.46.D ve Çizelge 3.25.). Bu durumda, X_1 ($p<0,0001$) ve X_2 ($p<0,0001$) anlamlı faktörler olarak belirlenmiştir. Her iki bağımsız değişkenin de Y_4 çıktısı üzerinde pozitif bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu pozitif etki hem borik asit miktarındaki artışın hem de desen değişiminin filmlerin mekanik direncini anlamlı derecede artırdığını göstermektedir ($p<0,05$). Desen değişiminin filmlerin mekanik direnci üzerinde en büyük etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Abdella vd. (2022)'nin çalışmasına benzer şekilde, desen değişimi (X_1), filmlerin mekanik direncinde varyasyonlara neden olmuştur. Kitozan kriyojel çalışmasında mekanik direnç değerlerinin $0,05 \text{ MPa} \pm 0,01$ ile $0,12 \text{ MPa} \pm 0,02$ arasında değiştiği bildirilmiştir (Bolgen vd., 2020). Buna göre, tüm 3B

baskılı filmler çok yüksek mekanik direnç sergilemiştir. Ayrıca, formülasyondaki borik asit miktarındaki artışın kitozan ile artan çapraz bağlanmaya bağlı olarak mekanik direnci artırdığı düşünülmektedir.

DoE sonuçlarına göre filmlerin %uzama-elastikiyet (Y_5) verileri, regresyon analizi kullanılarak Y_5 yanıtını tahmin etmek için uygun doğrusal denklem, istatistiksel olarak önemsiz terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_5 = 2,23889 + 0,0812222 * X_2$$

Eşitlik 4.11.

Y_5 yanıtına ait ölçümler %1,19 ile %8,59 arasında bulunmuştur. En yüksek elastikiyet, honeycomb desenli filmlerde gözlenmiştir. Deneysel veriler doğrusal modele uyum sağlamış ve modelin p-değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0270$). Bu etki, 3B grafik ve doğrusal denklem ile gösterilmiştir (Şekil 3.46.E ve Çizelge 3.25.). Bu durumda, X_2 ($p=0,0078$) anlamlı model terimi olarak belirlenmiş ve Y_5 çıktısı üzerinde pozitif bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu pozitif etki, borik asit miktarındaki artışın Y_5 çıktısını anlamlı derecede artırdığını göstermektedir ($p<0,05$). Abdella vd. (2022)'nin çalışmasına benzer şekilde, desen değişiminin (X_1) filmlerin elastikiyeti üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Fakat, kitozan ile borik asitin çapraz bağlanması nedeniyle formülasyondaki borik asit miktarındaki artışın elastikiyeti etkilediği düşünülmektedir. Buna ek olarak, mekanik dirençteki değişimin elastikiyetteki değişimle pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu durum, desen değişiminin bu yanıtla doğrudan bir etkisi olmasa da, mekanik dirençte meydana gelen değişimlerle ilişkili olarak elastikiyetteki değişiklikleri dolaylı olarak etkileyebileceğini göstermektedir.

DoE sonuçlarına göre filmlerin Young's modül (Y_6) verileri, regresyon analizi kullanılarak Y_6 yanıtını tahmin etmek için uygun doğrusal denklem, istatistiksel olarak önemsiz terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_6 = 0,884344 + 0,360111 * X_1$$

Eşitlik 4.12.

Young modül, filmlerin sertliğini tanımlar ve deformasyona karşı dirençlerini gösterir. Gerilme-gerinim eğrisinin eğimi Young modülünü verir ve eğimin artması daha yüksek gerilme kuvveti dayanımı anlamına gelir. Fakat, daha düşük bir eğim, daha düşük gerilme kuvveti dayanımı ve daha fazla deformasyon kapasitesini ifade eder. Basit bir ifadeyle, daha yüksek gerilme direnci ve büyük young modül değerleri sergileyen bir film, sert ve kırılıgandır

ve minimum uzama gösterir (Karki vd., 2016). Y_6 yanıtına ait ölçümler 0,71 MPa/% ile 2,94 MPa/% arasında değişmiştir. Young modül açısından en sert ve en kırılğan filmler, honeycomb ve grid desenli filmlerde elde edilmiştir. Deneysel veriler doğrusal modele uyum sağlamış ve modelin p-değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0007$). Bu etki, 3B grafik ve doğrusal denklem ile gösterilmiştir (Şekil 3.46.F ve Çizelge 3.25.). Buna göre, X_1 ($p=0,0004$) anlamlı faktör olarak belirlenmiş ve pozitif bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu pozitif etki, desen değişiminin Y_6 çıktısını istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığını göstermektedir ($p<0,05$). Kitozan kriyojel çalışmasında, Young modülü değerlerinin $0,02 \text{ MPa/\%} \pm 0,01$ ile $0,06 \text{ MPa/\%} \pm 0,01$ arasında değiştiği bildirilmiştir (Bolgen vd., 2020). Bu nedenle, tüm 3B baskılı filmlerin nispeten yüksek mekanik dayanım ve kırılğan özellikler sergilediği söylenebilir. Ayrıca, Young modülü ile hem mekanik dayanım hem de elastikiyet arasında bir korelasyon tespit edilmiştir ve pozitif yönlüdür ($p<0,05$). Bu durum, desen değişiminin (X_1) yanı sıra, borik asit miktarındaki artışın da dolaylı bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

DoE modellemesinde, ön çalışmalar temel alınarak, filmlerden borik asit salımının farklılaşmaya başladığı 15. dakikadaki şişme değerleri kullanılmıştır. DoE sonuçlarına göre filmlerin şişme derecesi (Y_7) verileri, regresyon analizi kullanılarak Y_7 yanıtını tahmin etmek için uygun doğrusal denklem, istatistiksel olarak önemsiz terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_7 = 353,557 + 141,35 * X_1 + 23,656 * X_2 - 5,00355 * X_1 X_2$$

Eşitlik 4.13.

Y_7 yanıtına ait ölçümler %433,33 ile %803,94 arasında değişmiştir. En yüksek şişme değerleri honeycomb ve grid desenli filmlerde elde edilmiştir. Deneysel veriler quadratik modele uyum sağlamış ve modelin p-değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$). Bu etki, 3B grafik ve quadratik denklem ile gösterilmiştir (Şekil 3.46.G ve Çizelge 3.25.). Bu verilere göre, X_1 ($p=0,0025$), X_2 ($p<0,0001$) ve X_1X_2 ($p=0,0028$) anlamlı faktörler olarak belirlenmiştir. Hem X_1 hem de X_2 değişkenleri Y_7 çıktısı üzerinde pozitif bir etkiye sahiptir ($p<0,05$). Filmlerin şişme davranışı üzerinde en büyük etkinin desen değişimi olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre, şişme verileri ile filmlerin kalınlıkları pozitif yönde korelasyon göstermektedir ($p<0,05$). Bu durum, desen değişikliğine bağlı olarak kalınlık sonuçlarında meydana gelen değişikliklerin, filmlerin şişme değerlerini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Daha kalın filmler, daha yüksek şişme değerleri sergilemiştir.

DoE modellemesinde, ön çalışmalar temel alınarak, filmlerden borik asit salımının farklılaşmaya başladığı 15. dakikadaki %kümülatif AÇEM verileri kullanılmıştır. DoE sonuçlarına göre filmlerin %AÇEM (Y_8) verileri, regresyon analizi kullanılarak Y_8 yanıtını tahmin etmek için uygun doğrusal denklem, istatistiksel olarak önemsiz terimler göz ardı edilerek aşağıdaki şekilde verilmiştir:

$$Y_8 = 47,8948 - 13,0771 * X_1 - 0,428031 * X_2 + 17,8174 * X_1^2$$

Eşitlik 4.14.

Y_8 yanıtına ait ölçümler %34,07 ile %82,14 arasında değişmiştir. En yüksek çözünmüş borik asit miktarı triangular desenli filmlerden elde edilmiştir. Deneysel veriler kuadratik modele uyum sağlamış ve modelin p-değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). Bu etki, 3B grafik ve kuadratik denklem ile ifade edilmiştir (Şekil 3.46.H ve Çizelge 3.25.). Bu verilere göre, X_1 ($p < 0,0001$), X_2 ($p = 0,0077$) ve X_1^2 ($p < 0,0001$) anlamlı faktörler olarak belirlenmiştir. Y_8 çıktısı üzerindeki etki incelendiğinde, X_1 ve X_2 değişkenlerinin katsayılarının negatif işaretlerinden dolayı Y_8 çıktısı üzerinde negatif yönde etkilidir ($p < 0,05$). Değerlendirilen tüm bağımsız değişkenler arasında, faktör katsayılarından da görülebileceği gibi, filmlerden borik asit salım hızı üzerinde en büyük etkiye sahip olan faktör desen değişimi olarak belirlenmiştir. Genel olarak, filmlerden borik asidin salım profili şişme davranışlarıyla açıklanmaktadır. Ancak bu çalışmada, filmlerin şişme özellikleri çözünme profilleriyle ters bir korelasyon göstermesine rağmen, istatistiksel korelasyon analizi, filmlerin çözünme özelliklerinin kalınlıkları ile negatif bir korelasyon sergilediğini göstermiştir ($p < 0,05$). Tüm filmlerde kalınlık arttıkça, difüzyon yollarının uzaması nedeniyle açığa çıkan borik asit miktarının azalmasıyla açıklanabilir (Lecomte vd., 2003). Ayrıca, klasik dozaj formlarından farklı olarak, 3B baskı ile desen değişikliğinin, film içindeki borik asidin serbest kalabilmesi için aşması gereken difüzyon yolunu değiştirdiği de görülmüştür.

Her bir faktör ve yanıt için kısıtlamalar uygulandıktan sonra, yazılım tarafından bağımsız değişkenler için çeşitli tahmini oranlar üretilmiştir. Sayısal optimizasyon, amaçların belirli bir aralıkta tutulması ve kısıtlamaların uygulanmasıyla elde edilmiştir. Yara örtüsü olarak kullanılabilirlik açısından birincil hedef, minimum 300 μm ve maksimum 600 μm kalınlık, maksimum adezyon, minimum 2,5 MPa ve maksimum 35 MPa mekanik direnç, maksimum esneklik, minimum Young modül, maksimum şişme derecesi ve minimum kümülatif etkin madde salım miktarının (çünkü ön çalışma verilerinde 5 dk gibi kısa sürede borik asit salımının olduğu tespit edilmişti) elde edilmesiydi. %yükleme kapasitesi optimizasyona dahil edilmemiştir çünkü denklem anlamlı sonuçlar vermemiştir. Yazılım tarafından önerilen çözüm, %0,762 maksimum istenirlik değeri ile zaten üretilmiş olan

formülasyonlardan honeycomb desen ve 30 mg borik asit miktarı içeren filmidir (Çizelge 2.23.). Bu çözüm, optimum formülasyon olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.47.).

Şekil 3.48.'de optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyonundan *in vitro* salım profili incelendiğinde, çözünmenin ilk 30 dakika içerisinde hızlı bir şekilde gerçekleştiği ve yaklaşık %50 oranında etkin maddenin salındığı gözlenmiştir. Bu hızlı çözünme fazı sonrasında çözünme profili plato seviyesine ulaşmış ve 240. dakikada çözünme oranı yaklaşık %55 civarında bulunmuştur. Optimize film formülasyonunun çözünme kinetikleri Çizelge 3.26.'da sunulmuştur. Kinetik modeller incelendiğinde, Korsmeyer-Peppas ($R^2=0,8453$) ve Weibull ($R^2=0,8459$) modellerinin çözünme verilerine en iyi uyum sergilediği belirlenmiştir. Özellikle, Weibull modelinin yüksek R^2 değeri ve düşük AIC değeri ile (AIC=35,2904) en uygun model olduğu görülmektedir. Ayrıca, Korsmeyer-Peppas modeli için elde edilen n değeri 0,1216 olarak bulunmuş, bu değer Fick difüzyon mekanizmasının çözünme sürecinde baskın olduğunu göstermiştir ($n<0,45$) (Ahmady vd., 2022; Estevinho vd., 2021). Diğer kinetik modeller (Sıfır derece, Birinci derece, Higuchi ve Hixson-Crowell) için negatif R^2 değerlerinin bulunması, bu modellerin optimize film formülasyonunun çözünme verilerini uygun şekilde tanımlayamadığını göstermektedir. Özellikle Higuchi modelinin düşük uyumu, etkin maddenin çözünme sürecinde yalnızca difüzyon kontrollü bir mekanizmanın etkili olmadığını desteklemektedir. Sonuç olarak, optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyonunun çözünme profili, hızlı bir başlangıç salımı ve ardından stabil bir çözünme fazı sergilemiş; çözünme süreci Weibull ve Korsmeyer-Peppas modelleriyle başarılı şekilde açıklanabilmektedir.

Şekil 3.49.'da sunulan SEM görüntüleri, optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyonunun yüzey morfolojisini detaylı bir şekilde ortaya koymaktadır. Görüntülerde, film yüzeyinin düzenli ve tekrarlayan honeycomb deseninde bir yapıya sahip olduğu ve CAD tasarım ile planlanan honeycomb desenle uyumlu olduğu net bir şekilde görülmektedir. Özellikle, ilk SEM görüntüsünde gözlenen düzgün dairesel yapılar ve merkezdeki kontrollü honeycomb boşluklar, baskı süreci sırasında malzemenin mekanik dayanımını korurken gözenekli bir yapı oluşturduğunu göstermektedir. İkinci görüntüde ise yüzeyin kenar bölgelerinde düzgün bir film hattı gözlenmiş, bu da baskı sürecinin homojenliğini ve borik asidin kitozan jel içerisinde kristallenmeden homojen şekilde dağıtılabilirdiğini desteklemektedir. Ayrıca honeycomb yapının gözenekli mikroyapıları, film üzerinde kontrollü çözünme ve etkin madde salımı üzerinde olumlu etkiler yaratması beklenen

bir durumdur. Çünkü yüzey alanını artırarak hem su penetrasyonunu kolaylaştırmakta hem de etkin maddenin difüzyonunu hızlandırmaktadır.

CCD tasarımıda kullanılan formülasyonların mikro-BT sonuçları Çizelge 3.27. ve Şekil 3.50.'de gösterilmiştir. Honeycomb desenli filmlerde kapalı gözenek sayısı 260 olarak bulunmuş ve açık gözeneklilik %99,37 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, diğer desenlerle kıyaslandığında en yüksek kapalı gözenek sayısına karşılık gelmekte olup, gelişmiş iç mimari özelliklerini ortaya koymaktadır. Kapalı gözenek sayısındaki artış, desen geometrisindeki farklılıklar nedeniyle gözenek yapısının daha organize ve sıkı hale gelmesiyle ilişkilendirilebilir. Tüm desenlerdeki %99'un üzerindeki açık gözeneklilik, formülasyonların yüksek şişme kabiliyetiyle uyumlu bulunmuştur. SMI değerlerine göre tüm filmlerdeki yapıların silindirik çubuk morfolojisine sahip olduğu belirlenmiştir. Doku bütünlüğü açısından incelendiğinde, en yüksek konnektivite değeri 874 ile honeycomb desenli 30 mg borik asit içeren örnekte gözlenmiştir. Bu durum, gözeneklerin birbirine bağlantılı olma düzeyinin bu desen ve formülasyonda optimum seviyede olduğunu göstermektedir. Anizotropi derecesi değerlendirildiğinde, honeycomb desenli örneklerde daha yüksek değerler (1,84–1,86) gözlenmiştir. Bu da yapıların yönlü (anizotropik) bir düzende basılabildiğini ve mekanik olarak daha dayanıklı olduklarını göstermektedir. Yüksek anizotropi, aynı zamanda yapının belirli yönlerde gerilmeye karşı daha dirençli olduğunu ve biyolojik uygulamalarda formun korunmasında etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. SEM ve optik mikroskopi gibi iki boyutlu analiz yöntemleri ile karşılaştırıldığında, mikro-BT yöntemi ile 3B baskılı filmlerin mikro-mimarisi daha detaylı ve hacimsel olarak incelenebilmiştir (Kilicarslan vd. 2018). Bu yöntem, iç yapının hacimsel görselleştirilmesine olanak tanıyarak, yalnızca yüzey değil, iç hacimsel parametrelerin de değerlendirilmesine katkı sağlamıştır. Çalışmamızın bulguları, mikro-BT analizinin, farklı desen tasarımları ile elde edilen kompleks yapıların morfolojik, gözeneklilik ve bağlantısallık gibi temel özelliklerini etkili şekilde ortaya koyabildiğini göstermektedir. Ayrıca, CCD ile elde edilen optimum film olan 30 mg borik asit içeren honeycomb desenli 3B basılmış filmlerin, mikro-BT incelemelerinde de yüksek anizotropi ve konnektivite değerlerine sahip olması yönüyle uygun mekanik özellikte film elde edilebilmesi açısından uyumlu bulunmuş ve yöntemler arası doğrulama sağlandığını ortaya koymuştur.

Şekil 3.51.'de verilen DSC analiz sonuçlarına göre, borik asite (A) ait termogramda literatürle uyumlu şekilde yaklaşık 125 ve 150°C civarında iki endotermik pik elde edilmiştir (Y. Wu vd., 2017). Bu pik, borik asitin kristal yapısını ve karakteristik erime sıcaklığını temsil etmektedir. Fiziksel karışımında (B), borik asite ait bu erime pikinin varlığını koruduğu

görülmüştür. Bu durum, bileşenler arasında fiziksel bir karışım olduğunu, ancak henüz tam bir moleküler etkileşim oluşmadığını göstermektedir. Kitozana (C) ait termogram, amorf bir yapıya işaret eden geniş ve düzensiz bir eğri sergilemiştir. Optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyonuna ait termogramda (D) ise borik asitin karakteristik erime pikinin kaybolduğu ve termogramın kitozana benzer bir amorf yapı gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, etkin maddenin polimer matriks içerisinde amorf bir şekilde dağıldığını ve fiziksel karışımdan farklı olarak daha güçlü bir moleküler etkileşim oluştuğunu göstermektedir.

Şekil 3.52.'de verilen FTIR spektrumunda, borik asite ait titreşim frekansları 3181, 2357, 2258, 2102, 1407, 1190 ve 881 cm^{-1} de bant vermiştir ve literatürle uyumlu bulunmuştur (Ahtaz vd., 2019; Özdemir ve Keskiner, 2018). Borik asit içeren filmlerin FTIR spektrumunda, kitozanın karakteristik bantları belirgindir ve kitozan için 3337 cm^{-1} olarak ölçülen hidrojen bağının karakteristik absorpsiyon bandının değişimi optimum film formülasyonu için 3252 cm^{-1} 'dir. Hidrojen bağlı O-H ve N-H'nin gerilme titreşimlerine karşılık gelen bölgedeki geniş bantın açıkça daha düşük dalga numaralarına kaydığı görülmektedir. Serbest hidroksil grupları daha yüksek frekans bölgesinde yayılırken, hidrojen bağı oluşumuyla daha düşük frekans aralığına yayılırlar (Liang vd., 2019). Bu durum, kitozan zincirleri ve borik asit molekülleri arasında hidroksil ve bor arasındaki elektrostatik etkileşim sebebiyle daha güçlü bir hidrojen bağı ağına neden olan çapraz bağlanma reaksiyonunun olduğunu düşündürmektedir. Bu değişiklikler, borik asit ile kitozan arasında hidrojen bağları gibi ikincil etkileşimlerin oluştuğunu ve etkin maddenin polimer matrikse başarılı bir şekilde yüklendiğini göstermektedir. Sonuç olarak, DSC ve FTIR analizleri birlikte değerlendirildiğinde, optimize edilmiş borik asit yüklü 3B basılmış film formülasyonunda etkin maddenin amorf formda bulunduğu, kitozan matriksiyle güçlü moleküler etkileşimler geliştirdiği ve fiziksel karışımdan farklı bir yapı oluşturduğu açıkça ortaya konulmuştur. Bu durum, çözünme profilini etkileyebilecek çaprazbağlı yapısal değişimdir.

DoE çalışması ile optimize edilen nanopartikül ve film formülasyonları birleştirilerek nanopartikül yüklü yara örtüsü formülasyonları hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimize edilmiş yara örtüsüne ait kalınlık, gerilme direnci, elastikiyet, young's modül, adezyon kuvveti, su buharı geçirgenliği ve oksijen geçirgenliği sonuçları Çizelge 3.28.'de özetlenmiştir. Yara örtüsünün ortalama kalınlığı $356,67 \pm 25,03 \mu\text{m}$ 'dir. Literatür taramalarında 50-500 μm kalınlığındaki filmlerin yara örtüsü olarak uygulanmasına dair çeşitli *in vitro-in vivo* çalışmalar bulunmaktadır ve yara örtüsü formülasyonumuz kalınlık açısından literatürle uyumludur (Devi ve Dutta, 2017; Goyanes vd., 2016; Sandri vd., 2013;

Yu vd., 2017; Zaman vd., 2011). Gerilme direnci değerinin $8,78 \pm 2,12$ MPa olması, örtünün kullanım sırasında yeterli mekanik stabilite sunduğunu ve günlük hareketlere dayanabileceğini göstermektedir. Ayrıca, elastikiyet yüzdesi $17,22 \pm 5,33$, Young's modülü değeri ise $0,63 \pm 0,06$ MPa/% olarak bulunmuştur. Sağlıklı koşullarda insan derisinden beklenen mekanik dayanıklılığa göre (2,5-16 MPa gerilme direnci ve %20-55 esneme) (Ji vd., 2024), nihai yara örtüsünün gerilme direnci bu aralık içerisinde olup ancak uzama yüzdeleri açısından değerlendirildiğinde formüllerin yeterince esnek olmadıkları görülmektedir. Fakat literatür çalışmalarında uygun mekanik direnç sağlandıktan sonra %2-4 aralığında değişen düşük elastikiyetin de potansiyel yara örtüsü uygulamalarında yeterli olabileceği tespit edilmiştir (Al-Sheerazee vd., 2024; Hafezi vd., 2019; Karagül vd., 2024). Düşük esneklik verilerine sahip bu filmlerin deriye kıyasla daha kırılğan bir yapıya sahip oldukları söylenebilir (Gomes Neto vd., 2019; Hafezi vd., 2019). Önemli bir diğer parametre olan adezyon kuvveti $2,382 \pm 0,19$ N olarak bulunmuştur. Bu değer, örtünün yaranın üzerine yeterli yapışma sağlayabileceğini göstermektedir (Arezomand vd., 2024; Hafezi vd., 2019). Bariyer özelliklerine bakıldığında su buharı geçirgenliği hızı $2302 \pm 12,23$ g/gün·m² olarak ölçülmüştür. İdeal bir yara iyileştirme ortamı için su buharı geçirgenliği hızı değerinin 2000–2500 g/gün·m² aralığında olması gerektiği literatürde bildirilmektedir (Al-Sheerazee vd., 2024; Tao vd., 2024; Tiwari vd., 2023). Bu açıdan 3B hazırlanmış honeycomb desen yara örtüsünün yaranın nemli kalmasını destekleyecek kadar geçirgen olduğunu ve aşırı sıvı kaybını önleyebileceğini göstermektedir. Oksijen geçirgenliği $49,25 \pm 8,17$ mg/l olarak negatif kontrol (38,16 mg/l) ve pozitif kontrol (62,34 mg/l) arasında bulunmuştur ve film yapısının mekanik koruma sağlarken aynı zamanda oksijen geçişine de izin veren gözenekli yapısıyla açıklanmaktadır (Jiang vd., 2016). Sonuç olarak, optimize edilmiş yara örtüsü formülasyonu, yeterli mekanik direnç, esneklik, adezyon, kontrollü su buharı ve oksijen geçirgenliği gibi yara iyileşmesi için gerekli temel özellikleri sağlayacak şekilde hazırlanabilmiştir.

Şekil 3.53.'te yara örtüsü formülasyonunun şişme derecesi grafiği verilmiştir. Yara örtüsü olarak kullanılacak filmlerin şişme davranışının belirlenmesi, filmlerin maserasyondan kaçınarak yaradan eksüdayı emme kapasitesini belirlemek için önemlidir (Al-Sheerazee vd., 2024). Eksüda birikimi mikrobiyal proliferasyonu destekleyebileceğinden, zamanında çıkarılması yara iltihabını baskılamak ve yara iyileşmesini desteklemek için kritik öneme sahiptir (Ji vd., 2024). İdeal bir yara örtüsünün emilim oranı %150'den yüksek olmalıdır. Yara örtüsünün maksimum şişmeye ulaştığı 10.dk'da %300'ün üzerinde şişme tespit edilmiştir. Bu da 3B basılmış yara örtüsünün planlanmış gözenekli yapısı sayesinde elde edilebilmiştir.

Liyofilize *H.perforatum* ekstresinin tüm örnekleme aralıklarında optimize edilmiş nanopartikül ve yara örtüsü sistemlerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek kümülatif salım gösterdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 3.54.). 24 saatlik süre boyunca liyofilize *H.perforatum* ekstresi, optimize nanopartikül ve yara örtüsü için sırasıyla %98,55, %74,78 ve %62,00 değerleri elde edilmiştir. Yara örtüsünde hiperisinin salım yüzdesinin daha düşük olması, nanopartikülde PCL'nin düşük hidrofilik özelliği sebebiyle meydana gelen yavaş biyobozunurluğu ile uzatılmış etkin madde salımının, bu nanopartiküllerin kitozan film gibi ikinci bir matris içerisine dağıtıldıklarında bu sürenin daha uzun olması ve dolayısıyla daha yavaş etkin madde açığa çıkışı ile açıklanabilir (Coco vd., 2023; Nafee vd., 2013; Pourhojat vd., 2016). Böylece daha uzun süre yara tedavisi sağlanmıştır.

Çizelge 3.29.'da sunulan *in vitro* çözünme hızı kinetikleri, optimize edilmiş *H.perforatum* yüklü nanopartikül formülasyonunun hiperisin salım özelliğini detaylı bir şekilde ortaya koymaktadır. Farklı kinetik modellerle yapılan değerlendirmeler sonucunda, Weibull modelinin en yüksek uyumu sağladığı gözlenmiştir ($R^2=0,9579$, $AIC=22,5546$, $MSC=2,6605$). Bu yüksek korelasyon katsayısı ve düşük AIC değeri, Weibull modelinin hiperisinin çözünme hızı verilerini en iyi temsil eden model olduğunu göstermektedir. Korsmeyer-Peppas modeline ait R^2 değeri de oldukça yüksek bulunmuştur ($R^2=0,8765$). Elde edilen n değeri ($n=0,3687$) ise salım mekanizmasının Fick difüzyon kontrollü olduğunu işaret etmektedir ($n<0,45$) (Ahmady vd., 2022; Estevinho vd., 2021). Bu sonuç, etkin madde salımının öncelikli olarak difüzyon mekanizmasıyla gerçekleştiğini, ancak tam bir sıfır ya da birinci derece kinetik profile uymadığını göstermektedir. Higuchi modeli ile de orta düzeyde bir uyum ($R^2=0,6858$) elde edilmiş; bu da çözünmenin kısmen difüzyon kontrollü olduğunu desteklemektedir. Ancak sıfır derece ve Hixson-Crowell modellerinin düşük uyumu, hiperisin salımının ne sabit hızda bir çözünme süreciyle ne de sadece yüzey alanındaki değişimle açıklanamayacağını göstermektedir. Sonuç olarak, optimize edilmiş *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü yara örtüsü formülasyonunda hiperisin salımının, difüzyon kontrollü bir mekanizma ile gerçekleştiği ve Weibull modeliyle en iyi şekilde tanımlandığı belirlenmiştir.

Şekil 3.55.'te optimize film ve optimize yara örtüsünün *in vitro* borik asit salım profilleri karşılaştırılmıştır. Optimize film formülasyonu, ilk 30 dakika içerisinde hızlı bir çözünme göstererek yaklaşık %50'lik bir etkin madde salımı gerçekleştirmiştir. Yara örtüsü ise daha yavaş bir çözünme profili sergilemiş ve %35 civarında bir salıma ulaşmıştır. Nanopartikül yüklü yara örtüsünde etkin maddenin nanopartikül varlığı sebebiyle artan polimer matris içinde daha kontrollü bir şekilde tutulduğu ve salımının difüzyonla sınırlı olduğu

düşünülmektedir. Ayrıca, nanopartiküllerin varlığı salımını yavaşlatmış, böylece daha uzun süreli bir salım sağlanmıştır.

Çizelge 3.30.'da optimize edilmiş *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü yara örtüsü formülasyonunun *in vitro* borik asit çözünme hızı kinetikleri sunulmuştur. Farklı kinetik modellerin analizi sonucunda, Weibull modelinin çözünme verilerini en iyi temsil ettiği görülmüştür ($R^2=0,8414$, $AIC=40,4635$, $MSC=1,3894$). Weibull modelinin yüksek R^2 değeri ve düşük AIC değeri, borik asit çözünmesinin bu modelle başarılı bir şekilde tanımlanabildiğini göstermektedir. Korsmeyer-Peppas modelinde de yüksek bir uyum gözlenmiştir ($R^2=0,7567$). Bu modele göre elde edilen n değeri ($n=0,2170$) çözünmenin Fick difüzyon mekanizmasına uygun olduğunu göstermektedir. Bu durum, borik asit salımının difüzyon kontrollü bir süreçle gerçekleştiğini düşündürmektedir. Higuchi modeli ile uyum bulunmamıştır ($R^2=0,0669$). Ayrıca sıfır derece ve birinci derece kinetik modelleri, negatif korelasyon katsayıları ile çözünme verilerini uygun şekilde temsil edememiştir. Sonuç olarak, optimize edilmiş *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü yara örtüsü formülasyonundan borik asit salımı, hızlı bir başlangıç ve ardından yavaşlayan bir çözünme profili sergileyerek Weibull modeli ile en iyi şekilde açıklanmıştır (Ahmady vd., 2022; Estevinho vd., 2021).

Nanopartikül, film ve yara örtüsü formülasyonlarına ait SEM görüntülerinde (Şekil 3.56.) yüzey görüntüleri incelendiğinde (A), nanopartikül formülasyonunda küçük, düzgün ve homojen dağılım gösteren partiküller gözlenmiştir. Partiküller arasında önemli bir agregasyon görülmesi de kriyoprotektandan gelen kümelenme gözlenmiştir. Film formülasyonunun yüzey görüntüsünde, CAD tasarımına uygun honeycomb desende gözenekli bir yapı olduğu desteklenmektedir. Yara örtüsü formülasyonuna ait yüzey görüntülerinde ise, film yapılarına benzer şekilde gözenekli ve nanopartiküllerin daha belirgin olduğu dalgalı bir yüzey morfolojisi görülmüştür. Yara örtüsünün içerisinde nanopartiküllerin genel olarak homojen dağıldığı söylenebilir. Yan kesit görüntüleri (B) değerlendirildiğinde, yara örtüsü formülasyonunun çok katmanlı bir yapı sergilediği gözlenmiştir. Tabakalar arası belirgin sınırlar ve heterojen bir iç yapı mevcuttur. Bu çok katmanlı yapının hem mekanik dayanıklılığı hem de etkin madde salımını modifiye edebileceğini kanıtlamaktadır. Genel olarak SEM analizleri, tüm formülasyonların morfolojik özelliklerinin hedeflenen uygulama amaçlarına uygun şekilde geliştirildiğini göstermektedir.

Boş nanopartikül içeren boş film, *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film ve yara örtüsü formülasyonlarının 3B mikroyapılarının analizleri

mikro-BT ile değerlendirilmiş ve sonuçlar, Çizelge 3.31. ve Şekil 3.57.'de gösterilmiştir. Toplam hacim ve numune hacmi değerleri incelendiğinde, borik asit içeren filmin diğer film formülasyonlarına kıyasla daha düşük hacim değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum, SEM görüntülerinde de tespit edildiği gibi (Şekil 3.56.) borik asidin film matrisine ilave edilmesiyle film yapısında bir miktar değişime neden olduğunu düşündürmektedir. Yara örtüsü ise en düşük toplam hacim ve numune hacmi değerlerine sahiptir, bu da daha yoğun ve sıkı bir yapı oluşturulduğunu göstermektedir. Nesne hacmi yüzdesi değerleri tüm gruplarda oldukça benzerdir ($\sim 0,099$), bu da formülasyonların genel yoğunluk düzeylerinin birbirine yakın olduğunu ancak yapı içi farklılıkların diğer parametrelerle daha iyi açıklanabileceğini göstermektedir. Kapalı gözenek sayısı incelendiğinde, borik asit içeren film ve yara örtüsü formülasyonlarının daha fazla kapalı gözenek içerdiği görülmüştür (sırasıyla 10 ve 11 kapalı gözenek). Bu artış, borik asitin matris içerisinde dağılması ile film yapısında meydana gelen çapraz bağlanma ile daha fazla mikro-gözenek oluştuğunu ve bu gözeneklerin bir kısmının tamamen izole yapılar oluşturduğunu göstermektedir. Açık gözenek alanı hacmi ve açık gözeneklilik yüzdeleri, özellikle borik asit içeren filmde diğerlerine kıyasla yüksek bulunmuştur (%63,57). Bu durum, borik asidin matris içinde çözünmesi veya dağılımı sırasında mikrokanaallar oluşturduğunu ve filmin gözenekli yapısını artırdığını düşündürmektedir. Yara örtüsü formülasyonunda ise açık gözeneklilik daha düşük bulunmuş (%53,59), bu da daha sıkı bir yapı oluşumu ile uyumlu bulunmuştur. Yara örtüsü formülasyonunda daha düşük açık gözeneklilik, uygulamada daha iyi bir bariyer fonksiyonu ve kontrollü nem kaybı avantajı sağlayabilir. Konnektivite değerleri, boş nanopartikül yüklü filmlerde oldukça yüksekken (68), diğer film ve yara örtüsü formülasyonlarında daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu, nanopartikül yüklemesinin film matrisinde daha fazla bağlantılı gözenek oluşturduğunu göstermektedir. Buna karşılık, yara örtüsü formülasyonunda düşük konnektivite (11) daha düzenli ve kontrollü bir iç yapı sağladığını işaret etmektedir. Anizotropi derecesi değerlendirildiğinde, boş nanopartikül yüklü filmlerin daha yüksek anizotropi (2,03–3,52) sergilediği, fakat yara örtüsü formülasyonunun daha düşük bir anizotropi derecesine (2,69) sahip olduğu görülmüştür. Düşük anizotropi, daha izotropik (yani her yönde daha homojen) bir yapıyı temsil etmekte olup, yara örtüsünün daha dengeli mekanik özelliklere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, Mikro-BT tarama sonuçları, her formülasyonun gözenek yapısı ve iç morfolojisi açısından belirgin farklılıklar sergilediğini ortaya koymuştur. Borik asit içeren filmler daha yüksek gözeneklilik ve konnektivite gösterirken, yara örtüsü formülasyonları daha sıkı, düşük gözenekli ve düzenli bir yapı ile yara iyileşmesine uygun bir fiziksel özellik profiline sahiptir.

Çizelge 3.32.'de yara örtüsü formülasyonunun 25 ± 2 °C sıcaklık ve 60 ± 5 % bağıl nem koşullarında 6 ay boyunca gerçekleştirilen stabilite testlerine ait bulgular sunulmuştur. Hiperisin ve borik asit için yükleme etkinlikleri başlangıçta sırasıyla %90,70 ve %98,74 olarak belirlenmiştir. Zamanla küçük düşüşler kaydedilmiş; 6. ay sonunda hiperisin için %90,48'e, borik asit için ise %98,57'ye gerileme gözlenmiştir. Ancak bu değişimler oldukça minimal olup, yükleme etkinliği değerleri 6 ay boyunca yüksek düzeylerde korunmuştur (%5'ten az değişim). Bu bulgular, etkin maddelerin polimerik matris içerisinde stabil kaldığını ve formülasyonun uzun süreli depolama koşullarında etkin madde taşıma kapasitesini koruyabildiğini göstermektedir. Hiperisin ve borik asit için *in vitro* çözünme hızlarında da zamanla azalmalar gözlenmiştir. Hiperisin için başlangıçta %52,40 olan %kümülatif AÇEM, 6. ayda %51,82'ye; borik asit için ise %19,95'ten %19,48'e düşmüştür. Bu değişimler çözünme performansında anlamlı bir kayıp olmadığını ve formülasyonun çözünme karakteristiklerini depolama süresince büyük ölçüde koruduğunu göstermektedir (%5'ten az değişim). Küçük sapmalar, polimer matrisin zamanla hafif fiziksel değişiklikler göstermesiyle açıklanabilir ancak bu değişiklikler biyolojik etkinlik açısından kritik bir etki oluşturmamaktadır. Adezyon kuvveti başlangıçta 2,38 N olarak ölçülmüş ve 6 ay boyunca yalnızca küçük bir azalma (2,35 N) gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, yara örtüsü formülasyonunun adezyon performansının zamanla korunduğunu göstermektedir (ICH-Q1E, 2017). Stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen tüm parametrelerdeki küçük değişimler, formülasyonun uzun dönem saklama koşullarında stabil kaldığını ve etkin madde salımı ile adezyon özelliklerini koruyabildiğini göstermiştir. Bu bulgular, yara örtüsü formülasyonunun hem raf ömrü açısından hem de tedavi sürecinde güvenilir bir seçenek olabileceğini desteklemektedir. 3B yara örtüsü hazırlanmasının başlıca amaçlarından biri de hastanelerde hastaya özel formül hazırlanması olduğundan 6 aylık stabilite sonuçları böyle bir formülasyonun uygulama sürecinde stabilite açısından problem oluşturmayacağını göstermektedir.

Yara örtülerinde antibakteriyel özellikler oldukça önemlidir, çünkü enfeksiyonlar genellikle yara iyileşmesinde gecikmelere yol açar. Üretilen 3B kitozan filmlerin antibakteriyel aktivitesi, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin temsilcileri olan *S.aureus* ve *E.coli*'ye karşı koloni sayım yöntemi ile değerlendirilmiştir (Ferrer vd., 2014). Çizelge 3.32.'de, optimize edilmiş film ve yara örtüsü formülasyonlarının *E.coli* ve *S.aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal etkinlikleri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Kontrol grubunda her iki mikroorganizma için de yüksek seviyede bakteri yükü gözlenmiştir (*E.coli*: 14×10^9 CFU/mL, *S.aureus*: 78×10^{12} CFU/mL). Uygulanan formülasyonlar bu başlangıç değerlerine kıyasla anlamlı düzeyde azalma sağlamıştır. Boş film formülasyonu, *E.coli*'ye

karşı 2,07 log azalma (%99,1 azalma) ve *S.aureus*'a karşı 7,53 log azalma (%100 azalma) göstermiştir. Bu sonuçlar, film formülasyonun kitozandan kaynaklanan antibakteriyel özelliklerinin ve taşıyıcı polimerlerin bakteriyel proliferasyonu kısmen sınırlandırabildiğini göstermektedir. Nanopartikül yüklü boş film, *E.coli* için 1,45 log azalma (%96,4 azalma) ve *S.aureus* için 7,66 log azalma (%100 azalma) sağlamıştır. *S.aureus* üzerindeki etkinlik çok yüksek olup (%100 azalma), gram pozitif bakterilere karşı formülasyonun oldukça güçlü bir etki gösterdiği görülmektedir. Ancak *E.coli*'deki etki, boş filme göre biraz daha düşüktür. Bu durum, nanopartiküllerin gram negatif bakteri hücre duvar yapısına nüfuz etmesinde sınırlamalar olabileceğini düşündürmektedir. Borik asit içeren film, *E.coli* için 1,24 log azalma (%94,3 azalma) ve *S.aureus* için 7,89 log azalma (%100 azalma) göstermiştir. Borik asidin bilinen antimikrobiyal özellikleri ile uyumlu olarak, özellikle *S.aureus* karşısında çok yüksek bir inhibisyon sağladığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, *E.coli* için elde edilen etkinlik, boş film ve nanopartikül yüklü boş filme göre bir miktar daha düşük kalmıştır. Yara örtüsü formülasyonu ise en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. *E.coli* için 2,3 log azalma (%99,5 azalma) ve *S.aureus* için 6,85 log azalma (%100 azalma) elde edilmiştir. Yara örtüsünün hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilere karşı etkin bir bariyer oluşturduğu ve mikrobiyal kontaminasyonu önemli ölçüde engelleyebildiği görülmektedir. *H.perforatum*'un da antimikrobiyal etkisi söz konusudur ancak gram negatiflerde gram pozitifler kadar etkili olmadığı belirlenmiştir (Kucuk ve Yıldırım, 2019; Lyles vd., 2017; Orhan vd., 2013). Bu nedenle de formülasyona hem gram pozitif hem gram negatiflerde etkili borik asidin ilavesi ile bu etki sağlanmıştır. Antibakteriyel borik asitin varlığının yanı sıra, birçok çalışmada kitozanın *S.aureus* ve *E.coli* üzerinde önemli inhibitör etkilere sahip olduğunu ve bu bakterilere karşı daha yüksek duyarlılık sergilediği bildirilmiştir (Boateng vd., 2008; Gunes ve Tihminlioglu, 2017; Rajinikanth vd., 2024; Sakai vd., 2024; Tao vd., 2024). Bu sonuçlar, geliştirilen formülasyonların özellikle yara iyileşme ortamında enfeksiyon riskini azaltmada etkili olabileceğini kanıtlamaktadır.

Hücrelere ekstraksiyon sıvısı eklenmesinden sonra Bölüm 2.2.12.1.'de açıklandığı şekilde sterilize edilen numunelerde (negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu, Grup 2: boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: Borik asit içeren film ve Grup 5: Yara örtüsü) hücre tabakası yayılımı, canlı hücre sayısı ve hücre büyüme inhibisyonu Şekil 3.58.-Şekil 3.60.'ta değerlendirilmiştir. Mikroskopik inceleme ve canlı hücre sayımı sonuçlarına göre, sitotoksikite test değerlendirmeleri Çizelge 3.34. ve Çizelge 3.35.'te özetlenmiştir.

Şekil 3.58.'deki mikroskopik görüntülerden elde edilen verilere göre, tüm gruplarda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde hücre tabakası yayılımı (confluency) büyük oranda korunmuştur (Çizelge 3.34.). Boş nanopartikül yüklü boş film (Grup 2) grubunda hücre tabakası yayılımı skoru 1 olarak belirlenmişken (yani hafif etki), nanopartikül yüklü boş film, borik asit içeren film ve yara örtüsü gruplarında (Grup3-5) bu skor 2 olarak bulunmuştur. Bu durum, bu gruplarda hafif düzeyde bir hücrel stres oluştuğunu düşündürmektedir. Hücre morfolojisi açısından incelendiğinde, nanopartikül yüklü boş film grubunda (Grup 3) morfolojik değişim skoru 3 olarak kaydedilmiş olup, bu da orta düzeyde hücre şekil değişikliği olduğunu göstermektedir. Diğer gruplarda ise hücrel morfolojik değişimler daha düşük seviyelerde (skor 1) gözlenmiştir. Ölü hücre miktarı (yüzen hücreler) açısından bakıldığında, boş nanopartikül yüklü boş film grubunda (Grup 2) yüzen hücre gözlenmemiştir (skor 0), diğer tüm gruplarda ise hafif artış (skor 1) mevcuttur. Hücre büyümesi inhibisyonu ise, nanopartikül yüklü boş film ve yara örtüsü gruplarında bir miktar artış göstermiştir (skor 1), diğerlerinde ise kayda değer bir inhibisyon gözlenmemiştir. Çizelge 3.35.'te sunulan sitotoksik cevap indekslerine göre, tüm formülasyonların sitotoksik olmadığı belirlenmiştir (hepsi "Hayır" sonucu vermiştir). Boş nanopartikül yüklü boş film (Grup 2) en düşük sitotoksik cevap indeksiyle (0,3) en az hücrel etkiyi gösterirken, nanopartikül yüklü boş film (Grup 3: 2,6) ve yara örtüsü (Grup 5: 2,3) gruplarında hafif düzeyde sitotoksik stres saptanmıştır. Bu sonuçlar, geliştirilen film ve yara örtüsü formülasyonlarının hücrel canlılık açısından güvenli olduğunu desteklemektedir (Al-Sheerazee vd., 2024; Bal-Öztürk vd., 2024).

Şekil 3.61. ve Şekil 3.62.'de çizik alanlara hücre göçü analizleri sunulmuştur. Deney gruplarından (pozitif kontrol grubu, Grup 2: boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: borik asit içeren film ve Grup 5: yara örtüsü) elde edilen ekstraksiyon sıvılarının eklenmesinden sonra 0, 12, 24 ve 36 saatlik periyotlarda çizik alanların daralma eğilimi izlenmiştir. Yara iyileşmesi, üst üste binen birkaç aşamaya ayrılan düzenli bir süreçtir. Fibroblast hücreleri, dokuların ECM'sini hücre göçü ile simüle ederek yara iyileşme sürecinde hayati bir rol oynar (Al-Sheerazee vd., 2024; Meenatchi vd., 2024; Mutlu vd., 2022; Yang vd., 2024; Zanchetta vd., 2024). Filmlerde oluşan yara yüzey alanları, beklendiği gibi zamanla hücre göçü ile küçülmüştür. Çizilmeyi takiben, hücre göçü kantitatif olarak ölçüldüğünde 36.saatın sonunda en fazla küçülme yara örtüsü (Grup 5) formülasyonunda gerçekleşmiştir. Hiperisin yüklü nanopartikül içeren film (Grup 3) ile borik asit yüklü film (Grup 4) karşılaştırıldığında, borik asidin daha fazla fibroblast hücre göçünü desteklediği görülmektedir. Bu da borik asidin yara örtüsünden hızlı çıkışına bağlı olarak hızlı etki göstermesi ile ifade edilebilir. İki etkin maddenin birlikte kullanımı ile en hızlı hücre göçü

elde edilmiştir (Grup 5). Elde edilen sonuçlar, liyofilize *H.perforatum* ekstresi ve borik asit içeren yara örtüsünün daha iyi bir yara iyileşme süreci için fibroblastların çoğalmasını ve migrasyonunu artırabildiğini göstermektedir. Kontrol grubunda gözlenen daha hızlı hücre göçü, hücrelerin standart kültür ortamında hiçbir dış stres faktörüne maruz kalmadan optimal proliferasyon ve migrasyon kapasitesine sahip olmaları ile açıklanabilir. Çünkü deney gruplarında ekstraksiyon sıvısına bağlı minimal çevresel değişiklikler nedeniyle hücre adaptasyon süreçleri gözlenmiş ve göç hızlarında hafif azalmaların bu stres faktörlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Merino-Casallo vd., 2022). Benzer şekilde, *H.perforatum* ekstresi içeren aljinat film yara örtüsü çalışmasında (Mutlu vd., 2022), fibroblast hücrelerindeki etkisi scratch assay ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, 24 saat sonunda daha az ekstre içeren film grubunda çizik alanının kapanması, 2 kat fazla ekstre içeren filmlere göre daha hızlı gerçekleşmiş ve kontrol grubuna benzer bir iyileşme oranı elde edilmiştir. Bu sonuçlar, *H.perforatum* ekstresinin düşük konsantrasyonlarda hücre göçünü destekleyebileceğini, ancak yüksek konsantrasyonların hücre migrasyonu üzerinde sınırlayıcı etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple bir nanopartikül içerisine yüklenerek verildiğinde salım hızının da yavaşlamasına bağlı olarak doza bağlı hücre migrasyonunu sınırlayıcı etkisi azalmış olacaktır.

Bölüm 2.2.13.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalar sonrasında tüm gruplarda gözlenen yara iyileşme süreci Şekil 3.63.'te gösterilmiştir. Görsel olarak, tüm gruplarda enfeksiyon, tahriş veya aşırı kızarıklık belirtisi gözlenmemiştir. Yara kapanma yüzdesi ve tüm gruplardaki yara alanı azalması Şekil 3.64. ve 3.65.'te gösterilmiştir. Aynı ayrı *H.perforatum* (Grup 3) ve borik asit içeren (Grup 4) formülasyonlarda 7.günde sırasıyla %36,76 ve %33,46 yara kapanması gözlenirken, *H.perforatum* ve borik asiti birlikte içeren formülasyonda (Grup 5) 7.günde %74,34 yara kapanması tespit edilmiştir. Sadece *H.perforatum* içeren filmde (Grup 3) 19 günde, sadece borik asit içeren filmde (Grup 4) ise 17 günde yara tamamen kapanırken, ikisini birlikte içeren formülasyonda (Grup 5) 13 günde %99'luk yara kapanması meydana gelmiştir. *In vivo* yara iyileşmesi çalışmaları incelendiğinde, *H.perforatum* içeren merhem (Chatzimisios vd., 2023), *H.perforatum* yağı içeren merhem (Nayak vd., 2017), *H.perforatum*'un zeytin yağı ekstre uygulaması (Suntar vd., 2010) gibi çalışmalarda 7 günde %20'den %80 aralığında yara iyileşme oranları görülmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, bizim çalışmamızda yara iyileşmesine olumlu etkileri bilinen kitozan ve borik asit kullanımının da katkısıyla, *H.perforatum* içeren nanopartikül yüklü yara örtüsü formülasyonları sayesinde literatürden benzer veya daha iyi

sonuçlar elde edilebileceği görülürken hem adezyon yapısı hem de yara boyutuna uygun şekilde 3B basılıp yaraya uygulanabilmesi yönleriyle daha avantajlı olduğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 3.36.'da yer alan veriler, hayvan deneyleri sonrasında çıkarılarak Mikro-BT ile analiz edilen yara dokularının (Grup 1: negatif kontrol grubu, Grup 2: boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: *H.perforatum* nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: Borik asit içeren film ve Grup 5: yara örtüsü ile tedavi edilen) mikro yapı özelliklerini yansıtmaktadır. Elde edilen sonuçlar, farklı gruplar arasında yara dokusunun yeniden yapılanma ve iyileşme sürecinde önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir. Mikro-BT analizinde hacimle ilgili parametreler arasında doku hacmi (tissue volume, TV), nesne hacmi (object volume, BV) ve yüzde nesne hacmi (percent object volume, BV/TV) bulunmaktadır. Doku hacmi, tanımlanan bölgenin toplam hacmini ifade eder ve deneyde genellikle yara defektinin kapladığı hacimdir. Yüzde nesne hacmi (BV/TV) de defekt hacminin ne kadarının doku tarafından doldurulduğunu oransal olarak ifade eder (An vd., 2017; Hestehave Pedersen vd., 2015). İyileşme ilerledikçe BV/TV yüzdesinin beklendiği gibi tüm gruplarda artması gözlenmiştir. Özellikle Grup 5'te, 21. günde $1,06 \pm 0,05$ 'lik BV/TV oranı ile en yüksek doku doluluk oranı elde edilmiştir. Buna karşılık, kontrol grubu (Grup 1)'nda bu oran yalnızca $0,26 \pm 0,07$ düzeyinde kalmıştır. Bu fark, yara örtüsü kullanılan grupta iyileşmenin çok daha ileri seviyede gerçekleştiğini göstermektedir. Fakat BV/TV oranı düşük kalan kontrol grubu ve Grup 2'de, defektin büyük kısmının hala dokuyla dolmadığı, iyileşmenin geride seyrettiği anlaşılmaktadır. Sonuç olarak hacim ölçümleri, özellikle Grup 5'in 21. günde en yüksek nesne hacmi ve nesne hacmi yüzdesine ulaşmasıyla, bu grubun daha etkin bir doku rejenerasyonuna sahip olduğunu göstermektedir.

Yüzey alanına ilişkin parametreler, doku yüzeyi (tissue surface, TS), nesne yüzeyi (object surface, BS) ve doku yüzey yoğunluğu (yüzey/hacim oranı, BS/TV) şeklindedir. Doku yüzeyi, ilgili hacim bölgesinin dış yüzey alanını tanımlar. İyileşme sürecinde defekt bölgesi yeni doku ile doldukça açık yüzey alanı azalabilir, ilerleyen günlerde doku yüzeyinde bir miktar azalma beklenir, çünkü defektin iç yüzeyleri yeni doku ile örtülerek serbest yüzey alanını daraltır (Hestehave Pedersen vd., 2015). Nesne yüzey yoğunluğu (BS/TV), yara yüzeyinin (nesne) toplam hacme oranıdır ve dokunun incelik ve karmaşıklık derecesini gösterir. İyileşmenin erken evrelerinde, oluşan doku parçacıkları küçük ve dağınık olduğu için BS/TV değeri başlangıçta belirli bir seviyeye kadar yükselir. Zamanla dokular kalınlaşıp birleşmeye başladığında, aynı hacim içindeki yüzey oranı nispeten azalabilir. Bu durum, trabeküler yapının kalınlaşıp yüzey karmaşıklığının azalmasıyla açıklanabilir. Grup 1 ve

Grup 4 dışında diğer gruplarda, 7. günde az miktarda da olsa oluşan küçük dokular nispeten yüksek bir yüzey/hacim oranına sahipken 21. güne gelindiğinde bu gruplarda BS/TV değerlerinde 14. güne kıyasla bir düşüş eğilimi gözlenmiştir. Bu da borik asitten ziyade hiperisinin doku iyileşmesini destekleyici etkisini göstermektedir. En yüksek doku yüzey alanı ve uygun yüzey yoğunluğu değerleriyle Grup 5, 21. günde $648,20 \pm 34,89 \text{ mm}^2$ doku yüzey alanı ve $0,47 \pm 0,31 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ nesne yüzey yoğunluğu ile yüzey karakteristiği bakımından da en iyi sonucu sergilemiştir. Buna karşın Grup 2’de (boş film) BS/TV değeri yalnızca $0,03 \pm 0,01$ olarak ölçülmüştür. Borik asit ile hiperisin birlikte verildiğinde en yüksek doku gelişimi gözlenmesi de bu iki bileşenin sinerjistik etkisiyle açıklanabilir ve bu sonuç da tez önerimizde sunulan hipotezi destekler niteliktedir.

Strüktür model indeksi (SMI), dokunun şekilsel karakterini yansıtan ve çubuk (rod) veya levha (plate) biçiminde olduğunu gösteren boyutsuz bir parametredir. Teorik olarak SMI değerinin 0’a yakın olması plağa benzer, 3’e yakın olması çubuğa benzer yapı anlamına gelir (Salmon vd., 2015). Deney gruplarımızda SMI, iyileşme ilerledikçe azalma eğilimi göstermiştir. 7. günde özellikle kontrol grubunda yeni doku yapıları çoğunlukla küçük ve izole olduğundan SMI değerleri göreceli olarak yüksektir (daha çubuk benzeri yapı). Zamanla tüm gruplarda SMI düşüş göstermiştir. SMI değeri Grup 5’te $3,49 \pm 0,23$ (7. gün) seviyesinden $3,40 \pm 0,35$ (21. gün)’e inerek, daha organize bir trabeküler yapı oluştuğunu göstermiştir. Kontrol grubunda ise $2,32 \pm 0,66$ ’dan $1,91 \pm 0,59$ ’a düşüş sınırlı kalmıştır. SMI’daki azalma, biyolojik olarak yara dokusunun matürasyonunu yansıtır; başlangıçta ince çubuklar halinde beliren yeni doku trabekülleri zamanla kalınlaşıp geniş yüzeyli yapılar haline gelmektedir. Bu değişim, dokunun taşıyabileceği yük kapasitesini artıran olumlu bir iyileşme göstergesidir. Bu bakımdan, SMI değeri en çok düşen (yani en plate-benzeri hale gelen) Grup 5’in doku kalitesinin en iyi olduğu söylenebilir.

Anizotropi derecesi (Degree of Anisotropy, DA), trabeküler yapının yönlü düzen gösterip göstermediğini, yani belirli bir baskın doğrultuda hizalanma olup olmadığını niceliksel olarak tanımlar. Değerin yüksek olması, trabeküler elemanların belirli bir yönde belirgin şekilde dizildiğini; düşük olması ise izotropik (her yönde eşdeğer) bir yapı olduğunu gösterir. Doku onarımı ve defekt iyileşmesi sırasında, başlangıçta gelişen yeni doku çoğunlukla rastlantısal yönelimlidir (düşük DA) (Cole vd., 2014). Deneyin 7. gün verilerinde grupların çoğunda DA değerleri düşüktür; oluşan az miktardaki doku, belirgin bir doğrultuda organize olacak kadar geniş bir ağ oluşturmamıştır. Bununla birlikte, tedavi ile iyileşmesi hızlanan gruplarda (özellikle Grup 3 ve Grup 5) defekt boyunca dokuların bağ oluşturmaları

başladığında trabeküler yapıların defekt eksenini doğrultusunda hizalanma eğilimi gösterdiği düşünülmektedir. Gerçekten de ilerleyen zamanla birlikte DA değerlerinde bazı gruplarda artış gözlenmiştir. Özellikle Grup 5'in anizotropi derecesi 7. günde $1,77 \pm 0,52$ iken 21. günde $2,67 \pm 0,46$ 'ya yükselmiştir. Bu belirgin artış, dokunun iyileşme süreci içinde belirli bir yönelim kazandığını ve daha fonksiyonel bir yapıya dönüştüğünü göstermektedir. Yani burada tek başına hiperisinin doku iyileşmesinin yanında borik asitle kombine kullanımında yara iyileşmesinin daha hızlı ve organize halde gerçekleştiği görülmektedir. Anizotropideki artış, iyileşen dokusunun fonksiyonel stres doğrultusunda yeniden şekillendiğinin yapısal göstergesidir. Bu bağlamda, 21. gün itibarıyla en yüksek DA değerine sahip olan Grup 5'te doku trabekülerinin belirgin bir yönde dizilim gösterdiği, yani defektin köprüleşmesinin ve mekanik yük aktarımının en ileri düzeyde sağlandığı söylenebilir.

Kapalı gözenek sayısı, defekt bölgesinde etrafı tamamen dokuyla çevrilmiş (dışarı ile bağlantısı olmayan) boşlukların adedini; açık porozite ise dış ortama veya taranan bölge dışına açılabilen gözenekli boşlukların oransal miktarını ifade eder. Toplam porozite ise açık ve kapalı tüm boşlukların, toplam hacme göre yüzdesidir (Lappalainen vd., 2016). Boşlukların hemen hepsi dışarı açık durumda olduğundan kapalı gözenek sayısı 7. günde ihmal edilebilir düzeydedir. Yani, erken dönemde defekt bölgesindeki boşluklar birbirleriyle ve dış ortamla bağlantılı tek bir büyük boşluk şeklindedir. Zaman ilerledikçe ve yeni doku defekt içine doğru büyüdükçe, bu boşluk hacmi kademeli olarak azalmıştır. Tüm gruplarda 14. ve 21. günlerde kapalı por sayısında artış gözlenmiştir; en belirgin artış, defekti en çok dolduran grup olan Grup 5'te gerçekleşmiştir. Örneğin Grup 5'in kapalı por sayısı 7. günde $366,57 \pm 53,84$ iken, 14. günde $585,03 \pm 67,44$ 'e ulaşmış ve 21. günde $416,75 \pm 139,75$ olarak ölçülmüştür. Bu değerler, yeni doku oluşumunun boşlukları kapsayarak ilerlediğini ve defekti önemli ölçüde doldurduğunu ortaya koymaktadır. Öte yandan, Grup 1'de kapalı por sayısı 21. günde yalnızca $13,50 \pm 4,93$ düzeyinde kalmıştır. Yeni doku trabekülleri defektin yüzeylerini kapatarak bazı boşlukları dış ortamdan yalıtmıştır. Bu süreç sonucunda 14. ve 21. günlerde kapalı gözenek sayısında artışlar kaydedilmiştir. Özellikle 14. gün civarında hızlı iyileşme gösteren gruplarda (örn. Grup 3, 4 ve 5), aniden çok sayıda kapalı boşluk oluştuğu gözlenmiştir; bu durum, yara dokusundaki boşlukların etrafını sararak onları tam anlamıyla kapatması ile açıklanır. Bununla birlikte, iyileşmenin sonuna doğru (21. günde) kapalı gözenek sayısında tekrar kısmi bir düşüş veya plato görülebilir; çünkü bir kısım kapalı boşluk tamamen dolarak ortadan kalkmakta, bir kısım boşluklar da birbirine birleşerek sayıca azalabilmektedir. Biyolojik açıdan değerlendirildiğinde, porozite ölçümlerindeki bu değişimler doku rejenerasyonunun doğal

seyrini yansıtır. İyileşmenin başında yeni doku oluşabilmesi için boşluk ve porozite gereklidir; poröz bir yapı kan damarı ve hücre invazyonuna izin vererek iyileşmeye zemin hazırlar.

Mikro-BT ile elde edilen topolojik parametrelerden bir diğeri Euler sayısı ve buna bağlı bağlantısallık (konnektivite) ölçümüdür. Trabeküler doku ağının ne kadar bağlantılı bir bütün oluşturduğunu değerlendirmek için Euler topolojik karakteristiği kullanılabilir. Euler sayısı kabaca, yapıda kopuk parça ve delik/topolojik döngü sayılarının bir kombinasyonu olarak hesaplanır; bu değerin küçük olması (düşük veya negatif Euler sayısı), yapıda çok sayıda döngüsel bağlantı olduğuna, yani elemanların tek parça halinde bağlantılı bir ağ oluşturduğuna işaret eder (Chiba vd., 2011). Yüksek Euler sayısı ise yapının parçalı veya az bağlantılı olduğunu gösterir. Bağlantısallık ise birim hacimdeki bağlantı sayısını ifade ederek benzer bir durumu nicel olarak sunar (Hestehave Pedersen vd., 2015; Salmon vd., 2015). İyileşme sürecinde beklendiği üzere, defekt içinde yeni doku arttıkça farklı trabeküler elemanlar birbirleriyle birleşmeye başlar ve sonuçta bağlantı sayısı artar. Deney gruplarımızda 7. günde Euler sayıları göreceli olarak yüksek (veya konnektiviteleri çok düşük) iken; bu dönemde genellikle her bir doku parçası izole olduğundan, belirgin bir trabeküler ağ yoktur. 14. ve 21. günlere gelindiğinde, özellikle başarılı iyileşme gösteren gruplarda Euler sayısının belirgin ölçüde düştüğü, bağlantısallığın ise yükseldiği gözlenmiştir. Grup 5, 21. gün itibarıyla en düşük Euler karakteristiğine ve en yüksek bağlantısallık değerine ulaşmıştır. Bu durum, Grup 5'te oluşan doku trabeküllerinin büyük ölçüde birbirleriyle birleşerek tek bir bağlantılı yapı oluşturduğunu, defekti bir köprü gibi kapattığını göstermektedir. Kontrol grubunda ise 21. günde dahi Euler sayısı yüksek kalmış, yani birbiriyle bağlantısız çok sayıda küçük doku parçası mevcut olmuştur; bu da defekt bölgesinde tam bir bütünleşik doku ağı oluşmadığını belirtir. Bağlantısallığı düşük kalan gruplarda yara dokusu segmentler halinde olduğu için mekanik dayanımın da düşük olması beklenir. Buna karşın bağlantısallık değeri yüksek olan gruplarda (örneğin Grup 5), trabeküler ağ içerisindeki alternatif yük aktarım yolları (döngüsel bağlantılar) fazladır ve bu da iyileşen dokusunun daha sağlam olduğunu gösterir. Yine burada da tek başına hiperisin (21. Günde Euler sayısı $-13,00 \pm 14,71$ ve konnektivite $610,00 \pm 28,27$) ve borik asidin (21. Günde Euler sayısı $-25,50 \pm 19,60$ ve konnektivite $748,29 \pm 15,80$) yara iyileşmesine etkisi incelendiğinde, birlikte kullanımlarının (21. Günde Euler sayısı $-12,88 \pm 9,99$ ve konnektivite $1129,25 \pm 228,98$) doku iyileşmesini daha organize ve mekanik olarak dayanıklı halde iyileştirdiğini göstermektedir.

Mikrofil enjeksiyonu sonrası yapılan mikro-BT analizinde nesne kalınlığı (Object thickness), nesne ayrımı (Object separation) ve nesne sayısı (Object number) parametreleri,

damar benzeri yapıların hacim içerisindeki morfometrik karakteristiklerini değerlendirmek amacıyla incelenmiştir. Bu parametreler, dolaylı olarak neovaskülarizasyonun yoğunluğu, organizasyonu ve olgunlaşma düzeyi hakkında bilgi vermektedir (Wang vd., 2016). Nesne kalınlığı, damar benzeri yapıların ortalama çapını göstermektedir. Damar kalınlığı, iyileşme sürecinde damar ağının ne kadar olgunlaştığını, büyük damarların mı yoksa ince kapiller ağların mı baskın olduğunu anlamaya yardımcı olur. Çalışmada 7, 14 ve 21. günlerde gruplar arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Grup 1 (Kontrol)'de nesne kalınlığı 7. günde düşükken ($0,37 \pm 0,06$ mm), 14. günde hafif bir artış göstermiştir ($0,45 \pm 0,13$ mm). Bu artış erken anjiogenez fazını işaret ederken, 21. günde değerlerin ($0,39 \pm 0,10$ mm) stabilize olması, damarların sınırlı kalınlıkta ve olgunlukta kaldığını düşündürmektedir. Grup 2, benzer bir seyir göstermiş, 21. gündeki kalınlık değeri ($0,48 \pm 0,08$ mm) biraz daha yüksek olup damar olgunlaşmasının daha ileri aşamada olduğunu düşündürmektedir. Grup 3'te 7. gün kalınlığı ($0,37 \pm 0,07$ mm) düşük iken 14. günde ($0,44 \pm 0,04$ mm) artış göstermiştir; 21. günde ($0,39 \pm 0,11$ mm) hafif düşüş gözlenmiştir, bu da erken fazda vasküler gelişimin başlayıp sonradan stabilize olduğunu göstermektedir. Yani hiperisinin anjiogenez fazını hızlandırdığı ifade edilebilir. Grup 4'te ilk günlerde damar kalınlıkları daha yüksektir ($0,42 \pm 0,13$ mm) ve özellikle 21. günde ($0,41 \pm 0,05$ mm) sabit kalmıştır. Bu durum, Grup 4'te vasküler ağın hızlıca olgunlaştığını ve kalın damarların oluştuğunu düşündürmektedir. Borik asit tek başına kullanıldığında, yara iyileşme evresinde hızlı anjiogenez sağlıyor denebilir. Grup 5, 7. günde ($0,54 \pm 0,04$ mm) en yüksek damar kalınlığına ulaşmıştır. Ancak 14. günde ($0,33 \pm 0,04$ mm) belirgin bir düşüş göstermiştir. 21. günde ise ($0,35 \pm 0,09$ mm) bu değer korunmuştur. Bu bulgu, Grup 5'te erken dönemde geniş çaplı damarlar oluştuğunu, sonrasında bu yapıların yerini ince kapiller ağın aldığını düşündürmektedir. Bu geçiş, vaskülogenezden anjiyogeneze, yani büyük damarlardan ince damar ağına geçişi yansıtmaktadır. Yani hiperisin ve borik asidin kombine kullanımının yara iyileşme aşamasında dokudaki anjiogenez aşamasında sinerjistik etki gösterdiği söylenebilir. Sonuç olarak, Grup 5'te damarlanmanın daha organize, kapiller tipte bir ağ şeklinde olduğu, Grup 4'te ise daha kalın ve az sayıda damar yapısının baskın olduğu anlaşılmaktadır. Yalcinkaya vd. (2022)'nin *H.perforatum* ile diğer ajanların karşılaştırıldığı çalışmada, *H.perforatum* ekstresi hızlı re-epitelizasyon, kolajen birikimi artışı ve daha az skar oluşumu sağlarken aynı zamanda iyi bir damar oluşumu (anjiyogenez) etkisinden de söz edilmiştir. Ancak, burada önemli olan, anjiyogenez etkisinin diğer ajanlarla (povidon, benzoin ve tretinoin) karşılaştırıldığında en dengeli olduğu bildirilmiştir. Tretinoinin anjiyogenezi iyi artırmasına rağmen re-epitelizasyonu geciktirdiği için genel iyileşmede *H.perforatum* kadar etkili olmadığı tespit edilmiştir. Literatürle uyumlu şekilde anjiyogenezi destekleyici etkisi hayvan modelinde doğrulanmıştır. Grup 1 ve grup 2 gibi ekstre içermeyen

gruplarda damar yoğunluğu daha az ve damarlar daha dağınık iken *H.perforatumun* düzenli ve işlevsel damar ağı oluşumunu desteklediği kanıtlanmıştır. Mikro-BT parametrelerinin birlikte değerlendirilmesi, hem niceliksel (örneğin doku hacmindeki artış) hem de niteliksel (trabeküler organizasyon ve bağlantı gibi) iyileşme göstergelerinin anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Sonuçlar, Grup 5'in yani nihai yara örtüsünün doku rejenerasyonunda diğer gruplara kıyasla üstün performans sergilediğini, buna karşılık bazı grupların (özellikle tedavisiz kontrol veya plasebo gruplarının) iyileşmesinin kısıtlı kaldığını açıkça ortaya koymaktadır.

Son olarak yara iyileşmesini desteklemek amacıyla farklı formülasyonlar (Grup 1: negatif kontrol grubu, Grup 2: boş nanopartikül yüklü boş film, Grup 3: *H.perforatum* nanopartikül yüklü boş film, Grup 4: Borik asit içeren film ve Grup 5: yara örtüsü) kullanılarak hazırlanan yara örtülerinin etkileri, histopatolojik bulgular, mikrofil uygulamaları ve doku kesitlerindeki damar yoğunluğu ile birlikte değerlendirilmiştir. Bulgular, Şekil 3.66.'da verildiği gibi grup bazlı olarak detaylandırılmış ve yara iyileşmesinin farklı parametreler üzerindeki etkileri ayrıntılı bir şekilde tartışılmıştır. Grup 1'de yara iyileşmesi doğal enflamasyon, proliferasyon, remodeling fazlarını izlemiş, ancak adneksal yapıların oluşmaması tam iyileşmenin sağlanamadığını göstermiştir. Mikrofil uygulamaları damar yapısının 21. günde belirgin şekilde azaldığını ortaya koymuştur. Histolojik olarak 7. günde şiddetli enflamasyon ve yeni damar oluşumu, 14. günde epitelizasyonun başladığı, 21. günde ise epitelizasyonun tamamlandığı ancak enflamasyonun devam ettiği gözlenmiştir. Bu durum, mikro-BT analizlerinde 21. günde Grup 1'in düşük BV/TV oranı ($0,26 \pm 0,07$), düşük kapalı por sayısı ($13,50 \pm 4,93$) ve düşük konnektivite ($132,25 \pm 29,67$) değerleriyle örtüşmektedir. Grup 2'de 7. günde şiddetli neovaskülerizasyon ve enflamasyon, 14. günde epitelizasyonun başladığı ve 21. günde tamamlandığı belirlenmiştir. Mikrofil analizleri 21. günde damar oluşumunun ciddi oranda azaldığını göstermiştir. Bu grupta kitozanın enflamasyonu baskılayıcı etkisi dikkat çekmiştir. Histolojik incelemelerde ise gevşek bağ dokunun ve yeni damarların yara kenarlarına kadar uzandığı görülmüştür. Bu bulgular, mikro-BT verilerinde nispeten düşük konnektivite ($84,43 \pm 21,31$) ve $0,28 \pm 0,06$ 'lık BV/TV oranı ile paralellik göstermektedir. Grup 3'te enflamasyon seviyesi diğer gruplara göre daha düşük, fibroblast aktivitesi ise daha organize bir şekilde ilerlemiştir. 7. günde kolajen ipliklerin görülmesi, yeniden modelleme fazının erken başladığını göstermiştir. 21. günde epitelizasyonun tamamlandığı, enflamasyonun ortadan kalktığı ve yoğun bir fibrosit ağırlıklı bağ doku geliştiği tespit edilmiştir. Mikrofil uygulamasında damar oluşumunun belirgin şekilde az olduğu gözlenmiştir. *H.perforatum*'un antienflamatuvar ve doku yenileyici etkisi burada öne

çıkıştır. Bu gözlemler, 21. günde $0,40 \pm 0,11$ 'lik BV/TV oranı, $610,00 \pm 28,27$ konnektivite ve $-13,00 \pm 14,71$ Euler sayısı ile mikro-BT verileriyle uyumludur. Grup 4'te 7. günde belirgin bir enflamasyon ve şiddetli neovaskülerizasyon gözlenmiştir. 14. günde epitelizeasyonun tamamlanmış olması ve perivasküler bölgelerde plazma hücresi ağırlıklı infiltrasyonların bulunması dikkat çekmiştir. 21. günde enflamasyonun azaldığı ve bağ dokunun sıkılaştığı gözlenmiştir. Mikrofil uygulamalarında belirgin damar oluşumları tespit edilmiştir. Bu bulgular, mikro-BT analizinde 21. gün sonunda yüksek kapalı por sayısı ($216,00 \pm 12,62$), yüksek konnektivite ($748,29 \pm 15,80$) ve $0,72 \pm 0,11$ BV/TV oranıyla desteklenmiştir. Grup 5'te yara iyileşmesinin hızı en yüksek bulunmuş, 7. günde şiddetli fibroblast artışı, yoğun neovaskülerizasyon ve hiperemi gözlenmiştir. 14. ve 21. günlerde epitelizeasyon tamamlanmış, enflamasyon ortadan kalkmış ve doku yeniden modellemesi ileri düzeye ulaşmıştır. Histolojik olarak fibroblast ağırlıklı sıkı bağ doku yapısı belirgin olarak izlenmiştir (Pena ve Martin, 2024). Mikrofil verilerinde damarlanmanın yoğun olduğu görülmüştür. Mikro-BT verileriyle karşılaştırıldığında, 21. günde Grup 5'in $1,06 \pm 0,05$ BV/TV oranı, en yüksek konnektivite değeri ($1129,25 \pm 228,98$) ve kapalı por sayısı ($416,75 \pm 139,75$) ile bu histolojik bulguların örtüştüğü ve iyileşmenin en ileri seviyede gerçekleştiği açıkça görülmektedir. Ayrıca, anizotropi derecesinin en yüksek olması ($2,67 \pm 0,46$), doku trabeküllerinin belirli bir yönde organize olduğunu ve mekanik fonksiyonel yeniden yapılanmanın sağlandığını göstermektedir. Genel olarak *H.perforatum*'un tek başına veya borik asit ile birlikte kullanımının, yara iyileşmesinde enflamasyonu azaltarak fibroblast aktivitesini artırdığını, epitelizeasyonu hızlandırdığını ve damarlanmayı desteklediğini göstermiştir. Tüm bu parametreler, Mikro-BT verileri ile uyumlu şekilde ilerlemiş ve iyileşmenin hacimsel, yapısal ve bağlantısal yönleriyle de doğrulanmıştır. En başarılı yara iyileşme yanıtı Grup 5'te gözlenmiştir. Bu durum, *H.perforatum*'un yara iyileşmesini optimize etme potansiyelini güçlü bir şekilde desteklemekte ve tez önerisinde sunulan hipotezin doğruluğunu pekiştirmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

H.perforatum yüklü nanopartikül içeren bor yüklü yara örtüsünün 3B basım ile üretimi ve değerlendirmesinin yapıldığı bu tez çalışmasında;

- Formülasyonda kullanılan *H.perforatum*'un etanollü ekstresi başarılı şekilde ve farmakope standartlarına uygunluğu kanıtlanarak elde edilmiş ve hiperisin ve psödohiperisinin UV spektrofotometrik yöntemle total miktarı ve valide edilmiş HPLC yöntemi ile de düşük konsantrasyonları bile hassasiyetle ve tekrarlanabilir şekilde analiz edilebilecek metot geliştirilmiştir.
- Formülasyonda kullanılan bor türevi borik asitin UV spektrofotometrik analizi Azometin-H spektrofotometrik yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve analitik validasyonu ile tekrarlanabilir hassas ölçüm yapılabildiği kanıtlanmıştır.
- DoE yaklaşımı kullanılarak CCD tasarım ile istenen partikül büyüklüğü ve dağılımına sahip *H.perforatum* yüklü PCL nanopartikül formülasyonları nanoçöktürme yöntemi ile oluşturulmuştur.
- Hazırlanan optimum nanopartikül formülasyonu ile PCL içerisinde enkapsüle edilen hiperisinin, polimer yapısının sağladığı koruma etkisiyle fotodegradasyondan korunabildiği kanıtlanmıştır.
- Kitozan jelden SSE 3B baskı ile katmanlı filmler farklı geometrik desen, kalınlık ve dolgu oranlarında basılmış, DoE yaklaşımı kullanılarak CCD tasarım ile istenen fiziksel özelliklere sahip borik asit yüklü 3B basılmış kitozan film formülasyonları oluşturulmuştur. Hazırlanan filmlerin karakterizasyon işlemleri başarıyla gerçekleştirilmiş, özellikle mikro-BT analizleri sayesinde SEM görüntüleri ile bile tam olarak temin edilemeyen sonuçlar ve yapısal analizler gerçekleştirilerek literatüre bu konuda katkı sağlanacak veriler elde edilmiştir.
- Optimizasyonu yapılan *H.perforatum* yüklü nanopartikülün yüklendiği ve borik asit içeren film formülasyonları kombine halde yara örtüsü formülasyonu olarak hazırlanmıştır. İstenen kalınlıkta filmler hazırlanırken nanopartiküllerin filmin yapısında bulunmasına bağlı olarak filmin iç yapısındaki değişimi yine Mikro-BT gibi modern bir analizle tespit edilmiştir.
- Hazırlanan yara örtüsü formülasyonunda 6 aylık stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen tüm parametreler, formülasyonun oda sıcaklığında stabil kaldığını ve etkin madde salımı ile adezyon özelliklerini koruyabildiğini göstermiştir.

- Hazırlanan yara örtüsünün antimikrobiyal aktivite testlerinde *H.perforatum* ve borik asitin kombine kullanımıyla hem gram pozitiflerde hem de gram negatiflerde etkili olduğu gösterilmiştir.
- Yara örtüsünün sitotoksik olmadığı, hücre büyümesini artırdığı hücre çalışmaları ile tespit edilmiştir. Scratch assay analizleri ile yara örtüsü formülasyonunun tedavideki etkinliği *in vitro* olarak gösterilmiştir.
- Ratlarda oluşturulan yara modeline uygulanan yara örtüsünün ilk 7 günden itibaren etkinliği gözle görülür şekilde tespit edilmiş ve farklı tedavi sürelerinde dokulardan alınan örneklerde yapılan histopatolojik test sonuçları ve mikro-BT analizleri ile *H.perforatum* ve borik asitin birlikte kullanımının, yara iyileşmesinde enflamasyonu azaltarak fibroblast aktivitesini artırdığı, epitelizasyonu hızlandırdığı ve damarlanmayı destekleyerek 7 günde %70 den fazla iyileşme sağlanarak yara iyileşmesi sağladığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında hedeflendiği şekilde yara tedavisinde doğal kaynaklı iki farklı etkin maddenin sinerjistik etkisinden yararlanılarak tek ilaç şekli ile kombine tedavi sağlayabilecek ve böylece acı vermeden kolayca uygulanabilecek, tedavi sürecinde boyutu değişen yaraya uygun boyutta hastaya özel olarak hazırlanabilen, ülkemiz doğal kaynaklarının kullanımını sağlayan, 3B basılmış modern yara örtüsü hazırlanmış ve yerel ilaç şekli olarak üretime kazandırılmaya hazır hale getirilmiştir.

Bu tez kapsamında geliştirilen kombine yara örtüsünün etkinliği başarıyla gösterilmiş olmakla birlikte, klinik çalışmalara yönelik detaylı değerlendirmeler için geliştirilen sistemin akut yara dışında kronik yara tipleri (diyabet, yatak yarası, yanık vb.) üzerinde uygulanabilirliği test edilerek, farklı yara tiplerine etkinliği değerlendirilebilir. Histopatolojik analizlerin daha ileri seviyeye taşınması için, proenflamatuvar ve anjiyogenik sitokinlerin (örneğin TNF- α , IL-6, VEGF, TGF- β) doku düzeyindeki ekspresyonlarının belirlenmesiyle, yara iyileşme sürecine olan katkı daha detaylı bir şekilde aydınlatılabilir. Ayrıca, hiperisin ve borik asitin birlikte kullanımına dayalı bu sistemin etki mekanizmasının moleküler düzeyde ortaya konulabilmesi amacıyla, hücre kültürü modellerinde gen ve protein düzeyinde yapılacak analizler (RT-qPCR, Western blot gibi) faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

- Abdelhamid, M., Corzo, C., Afonso Ulrich, J. A., Slama, E., Fröhlich, E., Lochmann, D., Reyer, S., Freichel, T., Spoerk, M., & Salar-Behzadi, S. (2024). Personalization of lipid-based oral dosage forms via filament-based 3D-printing. *Applied Materials Today*, 40(102399), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2024.102399>
- Abdella, S., Afinjuomo, F., Song, Y., Upton, R., & Garg, S. (2022). 3D printed bilayer mucoadhesive buccal film of estradiol: Impact of design on film properties, release kinetics and predicted in vivo performance. *International Journal of Pharmaceutics* 628(122324), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122324>
- Abdelwahed, W., Degobert, G., & Fessi, H. (2006). A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 309, 178-188. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.003>
- Abosabaa, S. A., ElMeshad, A. N., & Arafa, M. G. (2021). Chitosan Nanocarrier Entrapping Hydrophilic Drugs as Advanced Polymeric System for Dual Pharmaceutical and Cosmeceutical Application: A Comprehensive Analysis Using Box-Behnken Design. *Polymers*, 13(677), 1-16. <https://doi.org/10.3390/polym13050677>
- Abouelmagd, S. A., Sun, B., Chang, A. C., Ku, Y. J., & Yeo, Y. (2015). Release kinetics study of poorly water-soluble drugs from nanoparticles: are we doing it right? *Molecular Pharmaceutics*, 12(3), 997-1003. <https://doi.org/10.1021/mp500817h>
- Aguirre, A., Borneo, R., & León, A. E. (2013). Properties of triticale protein films and their relation to plasticizing-antiplasticizing effects of glycerol and sorbitol. *Industrial Crops and Products*, 50, 297-303. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.043>
- Ahmady, A. R., Razmjooee, K., Saber-Samandari, S., & Toghraie, D. (2022). Fabrication of chitosan-gelatin films incorporated with thymol-loaded alginate microparticles for controlled drug delivery, antibacterial activity and wound healing: In-vitro and in-vivo studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 223, 567-582. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.249>
- Ahmed, A. S., Mandal, U. K., Taher, M., Susanti, D., & Jaffri, J. M. (2018). PVA-PEG physically cross-linked hydrogel film as a wound dressing: experimental design and optimization. *Pharmaceutical Development and Technology*, 23(8), 751-760. <https://doi.org/10.1080/10837450.2017.1295067>
- Ahmed, M., Charyulu, R., Harish, N. M., & Prabhu, P. (2009). Formulation and In-vitro evaluation of Chitosan films containing tetracycline for the treatment of periodontitis. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3(2), 1-7. <https://doi.org/10.4103/0973-8398.55048>
- Ahtaz, S., Sher Waris, T., Shahzadi, L., Anwar Chaudhry, A., Ur Rehman, I., & Yar, M. (2019). Boron for tissue regeneration-it's loading into chitosan/collagen hydrogels and testing on chorioallantoic membrane to study the effect on angiogenesis. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 69(8), 525-534. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1581202>
- Ait Abderrahim, L., Taibi, K., Ait Abderrahim, N., Boussaid, M., Rios-Navarro, C., & Ruiz-Sauri, A. (2019). Euphorbia honey and garlic: Biological activity and burn wound recovery. *Burns*, 45(7), 1695-1706. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.05.002>
- Akmal Johari, M., Ali, F., Azmi, A. S., Anuar, H., Jamaluddin, J., & Hasham, R. (2024). Microencapsulation of *Acalypha indica* Linn. Extracts Using Chitosan-Polycaprolactone Blends.

- Al-Sheerazee, N. M. M. B., Özgen, S., & Özbaş, Z. (2024). Development of thymol-loaded polymeric films designed as wound dressing materials: Physical, antioxidant, antibacterial, cytocompatibility, and wound healing properties. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 97(105744), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105744>
- Alavi, S. E., Alavi, S. Z., Nisa, M. U., Koohi, M., Raza, A., & Ebrahimi Shahmabadi, H. (2024). Revolutionizing Wound Healing: Exploring Scarless Solutions through Drug Delivery Innovations. *Molecular Pharmaceutics*, 21(3), 1056-1076. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c01072>
- Alemdaroglu, C., Degim, Z., Celebi, N., Zor, F., Ozturk, S., & Erdogan, D. (2006). An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, 32(3), 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2005.10.015>
- Alencar de Queiroz, A. A., Abraham, G. A., Pires Camillo, M. A., Higa, O. Z., Silva, G. S., del Mar Fernandez, M., & San Roman, J. (2006). Physicochemical and antimicrobial properties of boron-complexed polyglycerol-chitosan dendrimers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(6), 689-707. <https://doi.org/10.1163/15685620677346313>
- Alhnan, M. A., Okwuosa, T. C., Sadia, M., Wan, K. W., Ahmed, W., & Arafat, B. (2016). Emergence of 3D Printed Dosage Forms: Opportunities and Challenges. *Pharmaceutical Research*, 33(8), 1817-1832. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1933-1>
- Ali, M., Motaal, A. A., Ahmed, M. A., Alsayari, A., & El-Gazayerly, O. N. (2018). An in vivo study of *Hypericum perforatum* in a niosomal topical drug delivery system. *Drug Delivery*, 25(1), 417-425. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1431977>
- Almeida, C. R., Serra, T., Oliveira, M. I., Planell, J. A., Barbosa, M. A., & Navarro, M. (2014). Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: unraveling the effect of 3-D structures on inflammation. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 613-622. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.035>
- Almukainzi, M., El-Masry, T. A., Negm, W. A., Elekhawy, E., Saleh, A., Sayed, A. E., Ahmed, H. M., & Abdelkader, D. H. (2022). Co-delivery of gentiopicroside and thymoquinone using electrospun m-PEG/PVP nanofibers: In-vitro and In vivo studies for antibacterial wound dressing in diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 625(122106), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122106>
- Altıparmak, M., Kule, M., Öztürk, Y., Çelik, S. Y., Öztürk, M., Duru, M. E., & Koçer, U. (2019). Skin wound healing properties of *Hypericum perforatum*, *Liquidambar orientalis*, and propolis mixtures. *European Journal of Plastic Surgery*, 42(5), 489-494. <https://doi.org/10.1007/s00238-019-01538-6>
- Alven, S., Peter, S., Mbese, Z., & Aderibigbe, B. A. (2022). Polymer-Based Wound Dressing Materials Loaded with Bioactive Agents: Potential Materials for the Treatment of Diabetic Wounds. *Polymers*, 14, 1-35. <https://doi.org/10.3390/polym14040724>
- Alves, M. P., Scarrone, A. L., Santos, M., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. (2007). Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 341, 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.03.031>
- An, J., Li, Y., Liu, Z., Wang, R., & Zhang, B. (2017). A micro-CT study of microstructure change of alveolar bone during orthodontic tooth movement under different force magnitudes in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13, 1793-1798. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4186>
- Ang, C. Y., Hu, L., Heinze, T. M., Cui, Y., Freeman, J. P., Kozak, K., Luo, W., Liu, F. F., Mattia, A., & DiNovi, M. (2004). Instability of *St. John's wort* (*Hypericum perforatum* L.) and degradation

- of hyperforin in aqueous solutions and functional beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6156-6164. <https://doi.org/10.1021/jf0490596>
- Anonymous. *Skin layers*. Altru Health System. Erişim tarihi 29 Nisan from <https://www.altru.org/health-resources>
- Anonymous. (2014). *StatSoft, Inc. Statistica (data analysis software systems), version 12*. www.statsoft.com.
- Arezomand, Z., Mashjoor, S., Makhmalzadeh, B. S., Shushizadeh, M. R., & Khorsandi, L. (2024). Citrus flavonoids-loaded chitosan derivatives-route nanofilm as drug delivery systems for cutaneous wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 271(132670), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132670>
- Arora, S., Gupta, S., Narang, R. K., & Budhiraja, R. D. (2011). Amoxicillin loaded chitosan-alginate polyelectrolyte complex nanoparticles as mucopenetrating delivery system for h. Pylori. *Scientia Pharmaceutica*, 79(3), 673-694. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1011-05>
- Arsić, I., Žugić, A., Antić, D. R., Zdunić, G., Dekanski, D., Marković, G., & Tadić, V. (2010). Hypericum Perforatum L. Hypericaceae/Guttiferae Sunflower, Olive and Palm Oil Extracts Attenuate Cold Restraint Stress – Induced Gastric Lesions. *Molecules*, 15(10), 6688-6698. <https://doi.org/10.3390/molecules15106688>
- Avato, P. and Guglielmi, G. (2008). Determination of Major Constituents in St. John's Wort Under Different Extraction Conditions. *Pharmaceutical Biology*, 42(1), 83-89. <https://doi.org/10.1080/13880200490505663>
- Aydın, D. Y., Gürü, M., Ayar, B., & Çakanyıldırım, Ç. (2016). Bor bileşiklerinin alev geciktirici ve yüksek sıcaklığa dayanıklı pigment olarak uygulanabilirliği. *Bor Dergisi*, 1(1), 33-39.
- Aydın, G. and Zorlu, E. B. (2022). Characterisation and Antibacterial Properties of Novel Biodegradable Films Based on Alginate and Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Extract. *Waste Biomass Valorization*, 13(6), 2991-3002. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01710-3>
- Ayran, İ. and Kan, Y. (2022). Examination of some quality analysis carried out to the determination of standardization of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) oil used in traditional medicine applications. *Biological Diversity and Conservation*, 15(2), 249-255. <https://doi.org/10.46309/biodicon.2022.1120535>
- Aysan, E., Idiz, U. O., Elmas, L., Saglam, E. K., Akgun, Z., & Yucel, S. B. (2017). Effects of Boron-Based Gel on Radiation-Induced Dermatitis in Breast Cancer: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Investigative Surgery*, 30(3), 187-192. <https://doi.org/10.1080/08941939.2016.1232449>
- Azad, A. K., Sermsintham, N., Chandkrachang, S., & Stevens, W. F. (2004). Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 69(2), 216-222. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30000>
- Badri, W., El Asbahani, A., Miladi, K., Baraket, A., Agusti, G., Nazari, Q. A., Errachid, A., Fessi, H., & Elaissari, A. (2018). Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and *Nigella Sativa* L. essential oil for the topical treatment of inflammation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.022>
- Badri, W., Miladi, K., Nazari, Q. A., Fessi, H., & Elaissari, A. (2017). Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 516, 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.12.029>
- Baktir, G. (2020). Wound Repair and Experimental Wound Models. *Experimed*, 9(3), 130-137. <https://doi.org/10.26650/experimed.2019.19023>

- Bal-Ozturk, A., Ozkahraman, B., Ozbaz, Z., Yasayan, G., Tamahkar, E., & Alarcin, E. (2021). Advancements and future directions in the antibacterial wound dressings - A review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(5), 703-716. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34736>
- Bal-Öztürk, A., Torkay, G., İdil, N., Özkahraman, B., & Özbaş, Z. (2024). Gellan gum/guar gum films incorporated with honey as potential wound dressings. *Polymer Bulletin*, 81(2), 1211-1228. <https://doi.org/10.1007/s00289-023-04763-z>
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., & Nagai, T. (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(4), 471-476. <https://doi.org/10.1081/ddc-100102197>
- Basha, M., AbouSamra, M. M., Awad, G. A., & Mansy, S. S. (2018). A potential antibacterial wound dressing of cefadroxil chitosan nanoparticles in situ gel: Fabrication, in vitro optimization and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 544(1), 129-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.021>
- Basit, H. M., Ali, M., Shah, M. M., Shah, S. U., Wahab, A., Albarqi, H. A., Alqahtani, A. A., Walbi, I. A., & Khan, N. R. (2021). Microwave Enabled Physically Cross Linked Sodium Alginate and Pectin Film and Their Application in Combination with Modified Chitosan-Curcumin Nanoparticles. A Novel Strategy for 2nd Degree Burns Wound Healing in Animals. *Polymers*, 13(2716), 1-26. <https://doi.org/10.3390/polym13162716>
- Bauer, S., Störmer, E., Graubaum, H. J., & Roots, I. (2001). Determination of hyperforin, hypericin, and pseudohypericin in human plasma using high-performance liquid chromatography analysis with fluorescence and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 765, 29-35.
- Beer, N., Hegger, I., Kaae, S., De Bruin, M. L., Genina, N., Alves, T. L., Hoebert, J., & Kalvemark Sporrang, S. (2021). Scenarios for 3D printing of personalized medicines - A case study. *Exploratory Research in Clinical and Social Pharmacy*, 4(100073), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.rcsop.2021.100073>
- Beg, S., Swain, S., Rahman, M., Hasnain, M. S., & Imam, S. S. (2019). Application of Design of Experiments (DoE) in Pharmaceutical Product and Process Optimization. In S. Beg & M. S. Hasnain (Eds.), *Pharmaceutical Quality by Design Principles and Applications* (ss. 43-64). Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815799-2.00003-4>
- Benderdour, M., Bui-Van, T., Dicko, A., & Belleville, F. (1998). In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 12(1), 2-7. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(98\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(98)80014-X)
- Benderdour, M., Van Bui, T., Hess, K., Dicko, A., Belleville, F., & Dousset, B. (2000). Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 14(3), 168-173. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(00\)80006-1](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(00)80006-1)
- Berce, C., Muresan, M. S., Soritau, O., Petrushev, B., Tefas, L., Rigo, I., Ungureanu, G., Catoi, C., Irimie, A., & Tomuleasa, C. (2018). Cutaneous wound healing using polymeric surgical dressings based on chitosan, sodium hyaluronate and resveratrol. A preclinical experimental study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 163, 155-166. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.041>
- Bergonzi, M. C., Bilia, A. R., Gallori, S., Guerrini, D., & Vincieri, F. F. (2001). Variability in the content of the constituents of *Hypericum perforatum* L. and some commercial extracts. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(6), 491-497. <https://doi.org/10.1081/ddc-100105173>
- Bhattacharya, S. (2022). Genotoxicity and in vitro investigation of Gefitinib-loaded polycaprolactone fabricated nanoparticles for anticancer activity against NCI-H460 cell lines. *Journal of Experimental Nanoscience*, 17(1), 214-246. <https://doi.org/10.1080/17458080.2022.2060501>

- Bilezikian, J. P. (2015). *The Parathyroids Basic and Clinical Concepts (Third Edition)*. Elsevier Inc.
- Bishnoi, M., Ankita, Mody, N., & Jain, A. (2024). Additive manufacturing strategies for personalized drug delivery systems and medical devices. In S. Mallakpour & C. M. Hussain (Eds.), *Medical Additive Manufacturing* (ss. 619-647). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-95383-2.00025-1>
- Błońska-Sikora, E., Zielińska, A., Dobros, N., Paradowska, K., & Michalak, M. (2025). Polyphenol and Flavonoid Content and Antioxidant Activity of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) Extracts for Potential Pharmaceutical and Cosmetic Applications. *Applied Sciences*, 15(2590), 1-13. <https://doi.org/10.3390/app15052590>
- Blouza, I. L., Charcosset, C., Sfar, S., & Fessi, H. (2006). Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *International Journal of Pharmaceutics*, 325, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.06.022>
- Boateng, J. (2024). Wound Dressings by 3D Printing. In D. A. Lamprou, D. Douroumis, & S. Qi (Eds.), *3D Printing of Pharmaceutical and Drug Delivery Devices: Progress from Bench to Bedside* (ss. 115-129). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119836001.ch6>
- Boateng, J. S., Hafezi, F., Tabriz, A. G., & Douroumis, D. (2023). 3D printed composite dressings loaded with human epidermal growth factor for potential chronic wound healing applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 86(104684), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104684>
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892-2923. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>
- Bolgen, N., Demir, D., Yalcin, M. S., & Ozdemir, S. (2020). Development of *Hypericum perforatum* oil incorporated antimicrobial and antioxidant chitosan cryogel as a wound dressing material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1581-1590. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.056>
- Brolis, M., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, R., Panzeri, F., & Peterlongo, F. (1998). Identification by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography–UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Chromatography A*, 825, 9-16.
- Budhian, A., Siegel, S. J., & Winey, K. I. (2007). Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(2), 367-375. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.061>
- Buke, A. N., Kilicarşlan, M., & Aslan Erdem, S. (2023, 2-6 July). *Determination of the Dissolution of Hypericin from Polymeric Nanoparticles by HPLC Analysis* [Bildiri sunumu]. 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Ankara, Türkiye.
- Büke, A. N. and Kılıçarslan, M. (2024). 3B basım ile kişiselleştirilmiş ilaç üretimi. In P. Yılğör Huri (Ed.), *Tıpta 3B basım uygulamaları* (ss. 80-85). Türkiye Klinikleri.
- Büke, A. N. and Kılıçarslan, M. (2025). Yara Örtülerinde Güncel Teknolojiler ve Farmasötik Karakterizasyon Yöntemleri. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 49(2), 590 - 614. <https://doi.org/10.33483/jfpau.1625859>
- Byun, Y., Hwang, J. B., Bang, S. H., Darby, D., Cooksey, K., Dawson, P. L., Park, H. J., & Whiteside, S. (2011). Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 24-28. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.032>

- Cabbaroğlu, D., Kodik, M. S., Uyanıkgil, Y., Uyanıkgil, E. Ö. Ç., Karabey, F., & Kıyan, S. (2019). Treatment of contact burn injury with hypericum perforatum: An experimental study. *Ege Tıp Dergisi*, 58(2), 154-160.
- Canpolat, İ., Eröksüz, Y., & Rızaoğlu, T. (2021). Effects on the Wound Healing Process Using Ozonated Oils (Sesame, Nigella Sativa , Hypericum Perforatum) in Rats. *Turkish Journal of Veterinary Research*, 5(1), 25-33. <https://doi.org/10.47748/tjvr.861722>
- Cao, A., Huang, D., Wang, Z., Hu, B., & Qiang, X. (2025). Enhanced physicochemical properties of chitosan films with in situ generation of kafirin particles: optimization via response surface methodology. *RSC Advances*, 15(1), 124-134. <https://doi.org/10.1039/d4ra07107g>
- Cardoso, P. H. N. and Araújo, E. S. (2024). An Approach to 3D Printing Techniques, Polymer Materials, and Their Applications in the Production of Drug Delivery Systems. *Compounds*, 4(1), 71-105. <https://doi.org/10.3390/compounds4010004>
- Carou-Senra, P., Rodriguez-Pombo, L., Awad, A., Basit, A. W., Alvarez-Lorenzo, C., & Goyanes, A. (2024). Inkjet Printing of Pharmaceuticals. *Advanced Materials*, 36(2309164), 1-28. <https://doi.org/10.1002/adma.202309164>
- Cascone, M. G., Zhu, Z. H., Borselli, F., & Lazzeri, L. (2002). Poly(vinyl alcohol) hydrogels as hydrophilic matrices for the release of lipophilic drugs loaded in PLGA nanoparticles. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 13(1), 29-32. <https://doi.org/Doi10.1023/A:1013674200141>
- Castro, F. C., Magre, A., Cherpinski, R., Zelante, P. M., Neves, L. M., Esquisatto, M. A., Mendonca, F. A., & Santos, G. M. (2012). Effects of microcurrent application alone or in combination with topical Hypericum perforatum L. and Arnica montana L. on surgically induced wound healing in Wistar rats. *Homeopathy*, 101(3), 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2012.05.006>
- Ceylan, S. (2021). An in vitro evaluation of Genipin-crosslinked and Hypericum perforatum incorporated novel membranes for skin tissue engineering applications. *Journal of Applied Polymer Science*, e51385, 1-10. <https://doi.org/10.1002/app.51385>
- Chand, R., Muhire, B. S., & Vijayavenkataraman, S. (2022). Computational Fluid Dynamics Assessment of the Effect of Bioprinting Parameters in Extrusion Bioprinting. *International Journal of Bioprinting* 8(2), 45-60. <https://doi.org/10.18063/ijb.v8i2.545>
- Chatzimisios, K., Tsioli, V., Brellou, G. D., Apostolopoulou, E. P., Angelou, V., Pratsinakis, E. D., Cremers, N. A. J., & Papazoglou, L. G. (2023). Evaluation of the Effectiveness of Medical-Grade Honey and Hypericum Perforatum Ointment on Second-Intention Healing of Full-Thickness Skin Wounds in Cats. *Animals*, 14(36), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ani14010036>
- Chen, J. P., Chang, G. Y., & Chen, J. K. (2008). Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 313, 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.04.129>
- Chen, Y., Lv, Y., Su, W., Wu, G., & Li, P. (2025). A gelatin-chitosan-based film containing berberine hydrochloride/polypyrrole that promotes infectious wound healing through antibacterial and antioxidant properties, and electrical conductivity. *International Journal of Biological Macromolecules* 305(141228), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.141228>
- Chiba, K., Ito, M., Osaki, M., Uetani, M., & Shindo, H. (2011). In vivo structural analysis of subchondral trabecular bone in osteoarthritis of the hip using multi-detector row CT. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(2), 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.11.002>
- Choi, J. S., Kim, D. W., Kim, D. S., Kim, J. O., Yong, C. S., Cho, K. H., Youn, Y. S., Jin, S. G., & Choi, H. G. (2016). Novel neomycin sulfate-loaded hydrogel dressing with enhanced physical dressing properties and wound-curing effect. *Drug Delivery*, 23(8), 2806-2812. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1089958>

- Chorny, M., Fishbein, I., Danenberg, H. D., & Golomb, G. (2002). Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of controlled release*, 83, 389-400.
- Coco, J., Silv rio, L., Santos,  ., Sueiro, A., Ataide, J., Paiva-Santos, A., & Mazzola, P. (2023). Piperine Extraction and Encapsulation in Polycaprolactone Nanoparticles. *Cosmetics*, 10(152), 1-15. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10060152>
- Cole, H. A., Ohba, T., Ichikawa, J., Nyman, J. S., Cates, J. M., Haro, H., Schwartz, H. S., & Schoenecker, J. G. (2014). Micro-computed tomography derived anisotropy detects tumor provoked deviations in bone in an orthotopic osteosarcoma murine model. *PLoS One*, 9(6), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097381>
- Colobatiu, L., Gavan, A., Mocan, A., Bogdan, C., Mirel, S., & Tomuta, I. (2019). Development of bioactive compounds-loaded chitosan films by using a QbD approach – A novel and potential wound dressing material. *Reactive and Functional Polymers*, 138, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.02.013>
- Comer, J. E. A. and Manallack, D. (2014). Ionization Constants and Ionization Profiles . In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.11233-8>
- Cossuta, D., Vatai, T., B Thori, M., Hohmann, J., Keve, T., & Sim ndi, B. (2012). Extraction of Hyperforin and Hypericin from St. John's Wort (*Hypericum Perforatum* L.) with Different Solvents. *Journal of Food Process Engineering*, 35(2), 222-235. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00583.x>
- Crapse, K. and Kyser, E. (2011). Literature Review of Boric Acid Solubility Data. *Savannah River National Laboratory. Aiken: SRNL*, 578, 1-33.
- Dabiri, G., Damstetter, E., & Phillips, T. (2016). Choosing a Wound Dressing Based on Common Wound Characteristics. *Advances in Wound Care*, 5(1), 32-41. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0586>
- Dadashzadeh, A., Imani, R., Moghassemi, S., Omidfar, K., & Abolfathi, N. (2019). Study of hybrid alginate/gelatin hydrogel-incorporated niosomal Aloe vera capable of sustained release of Aloe vera as potential skin wound dressing. *Polymer Bulletin*, 77(1), 387-403. <https://doi.org/10.1007/s00289-019-02753-8>
- Dai, C., Shih, S., & Khachemoune, A. (2020). Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. *Journal of Dermatological Treatment*, 31(6), 639-648. <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1530443>
- Daristotle, J. L., Lau, L. W., Erdi, M., Hunter, J., Djoum, A., Jr., Srinivasan, P., Wu, X., Basu, M., Ayyub, O. B., Sandler, A. D., & Kofinas, P. (2020). Sprayable and biodegradable, intrinsically adhesive wound dressing with antimicrobial properties. *Bioengineering & Translational Medicine*, 5(e10149), 1-12. <https://doi.org/10.1002/btm2.10149>
- De Moraes, F. A. P., Goncalves, R. S., Vilsinski, B. H., de Oliveira, E. L., Rocha, N. L., Hioka, N., & Caetano, W. (2019). Hypericin photodynamic activity in DPPC liposome. PART I: biomimetism of loading, location, interactions and thermodynamic properties. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 190, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.11.019>
- Degim, Z., Celebi, N., Sayan, H., Babul, A., Erdogan, D., & Take, G. (2002). An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. *Amino Acids*, 22(2), 187-198. <https://doi.org/10.1007/s007260200007>
- Demirci, S., Dogan, A., Aydin, S., Dulger, E. C., & Sahin, F. (2016). Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression, and inflammation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 417, 119-133. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2719-9>

- Demirci, S., Dogan, A., Karakus, E., Halici, Z., Topcu, A., Demirci, E., & Sahin, F. (2015). Boron and Poloxamer (F68 and F127) Containing Hydrogel Formulation for Burn Wound Healing. *Biological Trace Element Research*, 168, 169-180. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0338-z>
- Devi, N. and Dutta, J. (2017). Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1897-1904. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.080>
- Dharashivkar, S. S., Sahasrabuddhe, S. H., & Saoji, A. N. (2015). Niosomally encapsulated silver sulfadiazine gel for burn treatment. *Journal of Microencapsulation*, 32(2), 137-142. <https://doi.org/10.3109/02652048.2014.958202>
- Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings - a review. *BioMedicine*, 5(4), 22-28. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>
- Dikmen, M., Ozturk, Y., Sagratini, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., & Maggi, F. (2011). Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of *Hypericum perforatum* on cultured NIH3T3 fibroblasts. *Phytotherapy Research*, 25(2), 208-214. <https://doi.org/10.1002/ptr.3243>
- Dinh, L., Machamasi, R., Kim, C. J., Lee, J.-J., Choi, Y., Kim, H., Mahon, L., Grabenbauer, A., Yan, B., & Hwang, S.-J. (2024). 3D-printed chitosan-pectin-sodium alginate scaffolds for post-surgical peritoneal wound dressing and sustained delivery of oxaliplatin. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s40005-024-00704-8>
- Disch, L., Forsch, K., Siewert, B., Drewe, J., & Fricker, G. (2017). Sustained Release for St. John's Wort: A Rational Idea? *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 9(6), 565-576. <https://doi.org/10.4172/jbb.1000363>
- Diwan, R., Ravi, P. R., Agarwal, S. I., & Aggarwal, V. (2021). Cilnidipine loaded poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles for enhanced oral delivery: optimization using DoE, physical characterization, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 26(3), 278-290. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1864643>
- Dogan, A., Demirci, S., Caglayan, A. B., Kilic, E., Gunal, M. Y., Uslu, U., Cumbul, A., & Sahin, F. (2014). Sodium pentaborate pentahydrate and pluronic containing hydrogel increases cutaneous wound healing in vitro and in vivo. *Biological Trace Element Research*, 162, 72-79. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0104-7>
- Doukani, K., Selles, A. S. M., & Bouhenni, H. (2020). Hypericin and pseudohypericin. In T. Belwal, S. M. Nabavi, S. F. Nabavi, A. R. Dehpour, & S. Shirooie (Eds.), *Naturally Occurring Chemicals Against Alzheimer's Disease* (ss. 155-165). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819212-2.00013-x>
- Dousset, B., Benderdour, M., Hess, K., Mayap-Nzietchueng, R., Belleville, F., & Duprez, A. (2002). Effects of boron in wound healing. In A. M. Roussel, R. A. Anderson, & A. E. Favier (Eds.), *Trace Elements in Man and Animals* (ss. 1061-1065). Springer.
- Ebhodaghe, S. O. (2022). A short review on chitosan and gelatin-based hydrogel composite polymers for wound healing. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 33(12), 1595-1622. <https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2068941>
- Egilmez, O. K., Kokten, N., Ekici, A. I., Kalcioglu, M. T., Yesilada, E., & Tekin, M. (2015). The effect of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) on prevention of myringosclerosis after myringotomy in a rat model. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 79(7), 1128-1134. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2015.05.009>
- Egozi, D., Baranes-Zeevi, M., Ullmann, Y., Gilhar, A., Keren, A., Matanes, E., Berdicevsky, I., Krivoy, N., & Zilberman, M. (2015). Biodegradable soy wound dressings with controlled release of antibiotics: Results from a guinea pig burn model. *Burns*, 41(7), 1459-1467. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.03.013>

- El Hosary, R., El-Mancy, S. M. S., El Deeb, K. S., Eid, H. H., El Tantawy, M. E., Shams, M. M., Samir, R., Assar, N. H., & Sleem, A. A. (2020). Efficient wound healing composite hydrogel using Egyptian *Avena sativa* L. polysaccharide containing beta-glucan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 1331-1338. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.046>
- Elsner, J. J., Egozi, D., Ullmann, Y., Berdicevsky, I., Shefy-Peleg, A., & Zilberman, M. (2011). Novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics: results in a guinea pig burn model. *Burns*, 37(5), 896-904. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.02.010>
- Elviri, L., Bianchera, A., Bergonzi, C., & Bettini, R. (2017a). Controlled local drug delivery strategies from chitosan hydrogels for wound healing. *Expert opinion on drug delivery*, 14(7), 897-908. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1247803>
- Elviri, L., Foresti, R., Bergonzi, C., Zimetti, F., Marchi, C., Bianchera, A., Bernini, F., Silvestri, M., & Bettini, R. (2017b). Highly defined 3D printed chitosan scaffolds featuring improved cell growth. *Biomedical Materials*, 12(4), 045009. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa7692>
- EMA. (2009). *Community Herbal Monograph On Hypericum Perforatum L., Herba (Traditional Use)* (Doc. Ref.: HPMC/745582/2009., Issue.
- Endo, M., Yoshikawa, E., Nemoto, S., Takahashi, Y., Sakai, K., Mizuguchi, H., Sasaki, T., Sugawara, K., Sato, K., & Ihara, T. (2013). Simple and Rapid Determination of Boron in the Wastewater with Azomethine H Using Accelerating Effect of Ammonium Ion. *Journal of Water and Environment Technology*, 11(4), 355-365.
- EP10. (2021). *European Pharmacopoeia 10th Edition*. EDQM.
- Escarcega-Galaz, A. A., Sanchez-Machado, D. I., Lopez-Cervantes, J., Sanches-Silva, A., Madera-Santana, T. J., & Paseiro-Losada, P. (2018). Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 472-481. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.149>
- Estevinho, B. N., Horciu, I.-L., Blaga, A.-C., & Rocha, F. (2021). Development of Controlled Delivery Functional Systems by Microencapsulation of Different Extracts of Plants: *Hypericum perforatum* L., *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum*. *Food and Bioprocess Technology*, 14(8), 1503-1517. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02652-9>
- Fadel, M., Kassab, K., & Youssef, T. (2010). Photodynamic efficacy of hypericin targeted by two delivery techniques to hepatocellular carcinoma cells. *Lasers in Medical Science*, 25(5), 675-683. <https://doi.org/10.1007/s10103-010-0787-8>
- Farasati Far, B., Gouranmohit, G., Naimi-Jamal, M. R., Neysani, E., El-Nashar, H. A. S., El-Shazly, M., & Khoshnevisan, K. (2024). The potential role of *Hypericum perforatum* in wound healing: A literature review on the phytochemicals, pharmacological approaches, and mechanistic perspectives. *Phytotherapy Research*, 38(7), 3271-3295. <https://doi.org/10.1002/ptr.8204>
- Feldkamp, L. A., Goldstein, S. A., Parfitt, A. M., Jasion, G., & Kleerekoper, M. (1989). The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal Of Bone and Mineral Research*, 4(1), 3-11. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650040103>
- Ferrer, M. C. C., Dastgheyb, S., Hickok, N. J., Eckmann, D. M., & Composto, R. J. (2014). Designing nanogel carriers for antibacterial applications. *Acta Biomaterialia*, 10(5), 2105-2111. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.01.009>
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International journal of pharmaceutics*, 55(1), R1-R4.
- Fonder, M. A., Lazarus, G. S., Cowan, D. A., Aronson-Cook, B., Kohli, A. R., & Mamelak, A. J. (2008). Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound

- care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(2), 185-206. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.08.048>
- Fraj, A., Jaâfar, F., Marti, M., Coderch, L., & Ladhari, N. (2019). A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/ microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Industrial Crops and Products*, 140(111669), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111669>
- Friedrich, R. B., Fontana, M. C., Beck, R. C. R., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. (2008). Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. *Quimica Nova*, 31(5), 1131-1136. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500038>
- Funk, N. L., Leão, J., de Oliveira, T. V., & Beck, R. C. R. (2023). Semi-Solid Extrusion (SSE) in Pharmaceuticals. In S. Banerjee (Ed.), *Additive Manufacturing in Pharmaceuticals*. Springer.
- Gainza, G., Chu, W. S., Guy, R. H., Pedraz, J. L., Hernandez, R. M., Delgado-Charro, B., & Igartua, M. (2015). Development and in vitro evaluation of lipid nanoparticle-based dressings for topical treatment of chronic wounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 490, 404-411. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.075>
- Galinari, C. B., Biachi, T. P., Goncalves, R. S., Cesar, G. B., Bergmann, E. V., Malacarne, L. C., Kioshima Cotica, E. S., Bonfim-Mendonca, P. S., & Svidzinski, T. I. E. (2022). Photoactivity of hypericin: from natural product to antifungal application. *Critical Reviews in Microbiology*, 49(1), 38-56. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2022.2036100>
- Galvao Duarte, J., Piedade, A. P., Sarmento, B., & Mascarenhas-Melo, F. (2025). The Printed Path to Healing: Advancing Wound Dressings through Additive Manufacturing. *Advanced Healthcare Materials*, 14(e2402711), 1-37. <https://doi.org/10.1002/adhm.202402711>
- Gaohua, L., Miao, X., & Dou, L. (2021). Crosstalk of physiological pH and chemical pKa under the umbrella of physiologically based pharmacokinetic modeling of drug absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 17(9), 1103-1124. <https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1951223>
- Geçgel, D. S. (2018). *Pulmoner Yolla Veriliş İçin Rutin Hidrat İçeren Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve İn vitro Olarak Değerlendirilmesi* [Ankara Üniversitesi]. Ankara.
- Gianino, E., Miller, C., & Gilmore, J. (2018). Smart Wound Dressings for Diabetic Chronic Wounds. *Bioengineering*, 5(3), 1-26. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5030051>
- Gioti, E. M., Skalkos, D. C., Fiamegos, Y. C., & Stalikas, C. D. (2005). Single-drop liquid-phase microextraction for the determination of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in biological fluids by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1093, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.038>
- Gobi, R., Ravichandiran, P., Babu, R. S., & Yoo, D. J. (2021). Biopolymer and Synthetic Polymer-Based Nanocomposites in Wound Dressing Applications: A Review. *Polymers*, 13(1962), 1-23. <https://doi.org/10.3390/polym13121962>
- Gomes Neto, R. J., Genevro, G. M., Paulo, L. A., Lopes, P. S., de Moraes, M. A., & Beppu, M. M. (2019). Characterization and in vitro evaluation of chitosan/konjac glucomannan bilayer film as a wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 212, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.017>
- Gomez-Gaete, C., Tsapis, N., Besnard, M., Bochot, A., & Fattal, E. (2007). Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(2), 153-159. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.028>

- Goole, J. and Amighi, K. (2016). 3D printing in pharmaceuticals: A new tool for designing customized drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 499, 376-394. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.071>
- Goyanes, A., Det-Amornrat, U., Wang, J., Basit, A. W., & Gaisford, S. (2016). 3D scanning and 3D printing as innovative technologies for fabricating personalized topical drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 234, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.034>
- Grabnar, P. A. and Kristl, J. (2011). The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers. *Journal of Microencapsulation*, 28(4), 323-335. <https://doi.org/10.3109/02652048.2011.569763>
- Guleken, Z., Depciuch, J., Ege, H., Ilbay, G., Kalkandelen, C., Ozbeyli, D., Bulut, H., Sener, G., Tarhan, N., & Erdem Kuruca, S. (2021). Spectrochemical and biochemical assay comparison study of the healing effect of the Aloe vera and Hypericum perforatum loaded nanofiber dressings on diabetic wound. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 254(119639), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119639>
- Gull, N., Khan, S. M., Zahid Butt, M. T., Khalid, S., Shafiq, M., Islam, A., Asim, S., Hafeez, S., & Khan, R. U. (2019). In vitro study of chitosan-based multi-responsive hydrogels as drug release vehicles: a preclinical study. *RSC Advances*, 9(53), 31078-31091. <https://doi.org/10.1039/c9ra05025f>
- Gultekin, H. E., Tort, S., & Acarturk, F. (2019). An Effective Technology for the Development of Immediate Release Solid Dosage Forms Containing Low-Dose Drug: Fused Deposition Modeling 3D Printing. *Pharmaceutical Research*, 36(128), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2655-y>
- Gunes, S., Tamburaci, S., & Tihminlioglu, F. (2020). A novel bilayer zein/MMT nanocomposite incorporated with H. perforatum oil for wound healing. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(7), 1-19. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6332-9>
- Gunes, S. and Tihminlioglu, F. (2017). Hypericum perforatum incorporated chitosan films as potential bioactive wound dressing material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 933-943. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.080>
- Gunpinar, S., Kilic, O. A., Duran, I., Tosun, M., Firat, T., & Soyler, G. (2020). Evaluation of the Effect of Topical Hypericum perforatum Oil on Excisional Palatal Wound Healing in Rabbits. *Journal of Investigative Surgery*, 33(1), 49-58. <https://doi.org/10.1080/08941939.2018.1474980>
- Gültekin, H. E., Tort, S., & Acartürk, F. (2022). Fabrication of three dimensional printed tablets in flexible doses: A comprehensive study from design to evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74(103538), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103538>
- Hafezi, F., Scoutaris, N., Douroumis, D., & Boateng, J. (2019). 3D printed chitosan dressing crosslinked with genipin for potential healing of chronic wounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 560, 406-415. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.020>
- Haider, M., Elsayed, I., Ahmed, I. S., & Fares, A. R. (2021). In Situ-Forming Microparticles for Controlled Release of Rivastigmine: In Vitro Optimization and In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*, 14(66), 1-21. <https://doi.org/10.3390/ph14010066>
- Hamed, Z. S., Manafi, A., Hashemi, S. S., Mehrabani, D., Seddighi, A., Tanideh, N., & Mokhtari, M. (2024). Healing Effect of Hypericum perforatum in Burn Injuries. *World Journal of Plastic Surgery*, 13(3), 57-65. <https://doi.org/10.61186/wjps.13.3.57>
- Hammer, K. D., Hillwig, M. L., Solco, A. K., Dixon, P. M., Delate, K., Murphy, P. A., Wurtele, E. S., & Birt, D. F. (2007). Inhibition of prostaglandin E2 production by anti-inflammatory Hypericum perforatum extracts and constituents in RAW264.7 mouse macrophage cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7323-7331.

- Hasan, A. S., Socha, M., Lamprecht, A., Ghazouani, F. E., Sapin, A., Hoffman, M., Maincent, P., & Ubrich, N. (2007). Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International Journal of Pharmaceutics*, 344, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.066>
- Herman, A. and Herman, A. P. (2023). Herbal Products and Their Active Constituents for Diabetic Wound Healing-Preclinical and Clinical Studies: A Systematic Review. *Pharmaceutics*, 15(281), 1-27. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010281>
- Hestehave Pedersen, R., Rasmussen, M., Overgaard, S., & Ding, M. (2015). Effects of P-15 Peptide Coated Hydroxyapatite on Tibial Defect Repair In Vivo in Normal and Osteoporotic Rats. *BioMed Research International*, 2015(253858), 1-14. <https://doi.org/10.1155/2015/253858>
- Hong, H. J., Jin, S. E., Park, J. S., Ahn, W. S., & Kim, C. K. (2008). Accelerated wound healing by smad3 antisense oligonucleotides-impregnated chitosan/alginate polyelectrolyte complex. *Biomaterials*, 29, 4831-4837. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.08.023>
- Huanbutta, K., Burapapadh, K., Sriamornsak, P., & Sangnim, T. (2023). Practical Application of 3D Printing for Pharmaceuticals in Hospitals and Pharmacies. *Pharmaceutics*, 15(1877), 1-19. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071877>
- Huang, C., Xu, X., Fu, J., Yu, D. G., & Liu, Y. (2022). Recent Progress in Electrospun Polyacrylonitrile Nanofiber-Based Wound Dressing. *Polymers*, 14(3266), 1-33. <https://doi.org/10.3390/polym14163266>
- Hurler, J., Berg, O. A., Skar, M., Conradi, A. H., Johnsen, P. J., & Skalko-Basnet, N. (2012). Improved burns therapy: liposomes-in-hydrogel delivery system for mupirocin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(10), 3906-3915. <https://doi.org/10.1002/jps.23260>
- Hurler, J. and Skalko-Basnet, N. (2012). Potentials of chitosan-based delivery systems in wound therapy: bioadhesion study. *Journal of Functional Biomaterials*, 3(1), 37-48. <https://doi.org/10.3390/jfb3010037>
- Hurler, J., Zakelj, S., Mravljak, J., Pajk, S., Kristl, A., Schubert, R., & Skalko-Basnet, N. (2013). The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(1), 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.033>
- Huygens, A., Kamuhabwa, A. R., & de Witte, P. A. M. (2005a). Stability of different formulations and ion pairs of hypericin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(3), 461-468. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.09.014>
- Huygens, A., Kamuhabwa, A. R., Van Laethem, A., Roskams, T., Van Cleynenbreugel, B., Van Poppel, H., Agostinis, P., & De Witte, P. A. M. (2005b). Enhancing the photodynamic effect of hypericin in tumour spheroids by fractionated light delivery in combination with hyperoxygenation. *International journal of oncology*, 26(6), 1691-1697. <https://doi.org/10.3892/ijo.26.6.1691>
- Ianno, V., Vurpillot, S., Prillieux, S., & Espeau, P. (2024). Pediatric Formulations Developed by Extrusion-Based 3D Printing: From Past Discoveries to Future Prospects. *Pharmaceutics*, 16(441), 1-21. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16040441>
- Ibraheem, D., Iqbal, M., Agusti, G., Fessi, H., & Elaissari, A. (2014). Effects of process parameters on the colloidal properties of polycaprolactone microparticles prepared by double emulsion like process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445, 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.01.012>
- ICH-Q1A(R2). (2003). Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. In *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. ICH.

- ICH-Q1E. (2017). ICH Q1E Evaluation for stability data. In *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. ICH.
- ICH-Q2(R1). (2005). Topic Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. In *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. EMEA.
- Ignatova, M., Manolova, N., Markova, N., & Rashkov, I. (2009). Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing applications. *Macromolecular Bioscience*, 9(1), 102-111. <https://doi.org/10.1002/mabi.200800189>
- Ilhan, E., Cesur, S., Guler, E., Topal, F., Albayrak, D., Guncu, M. M., Cam, M. E., Taskin, T., Sasmazel, H. T., Aksu, B., Oktar, F. N., & Gunduz, O. (2020). Development of Satureja cuneifolia-loaded sodium alginate/polyethylene glycol scaffolds produced by 3D-printing technology as a diabetic wound dressing material. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1040-1054. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.086>
- Ilhan, M., Kilicarslan, M., & Orhan, K. (2022). Effect of process variables on in vitro characteristics of clindamycin phosphate loaded PLGA nanoparticles in dental bone regeneration and 3D characterization studies using nano-CT. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 76(103710), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103710>
- Intini, C., Elviri, L., Cabral, J., Mros, S., Bergonzi, C., Bianchera, A., Flammini, L., Govoni, P., Barocelli, E., Bettini, R., & McConnell, M. (2018). 3D-printed chitosan-based scaffolds: An in vitro study of human skin cell growth and an in-vivo wound healing evaluation in experimental diabetes in rats. *Carbohydrate Polymers*, 199, 593-602. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.057>
- Isacchi, B., Bergonzi, M. C., Carnevali, F., van der Esch, S. A., Vincieri, F. F., & Bilia, A. R. (2007). Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45(5), 756-761. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.08.025>
- Ishfaq, B., Khan, I. U., Khalid, S. H., & Asghar, S. (2023). Design and evaluation of sodium alginate-based hydrogel dressings containing Betula utilis extract for cutaneous wound healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11(1042077), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1042077>
- ISO. (2009). Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, ISO 10993. *Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization*.
- Jaiswal, L., Shankar, S., & Rhim, J. W. (2019). Carrageenan-based functional hydrogel film reinforced with sulfur nanoparticles and grapefruit seed extract for wound healing application. *Carbohydrate Polymers*, 224(115191), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115191>
- Javid, S., Ahmad, N. M., Mahmood, A., Nasir, H., Iqbal, M., Ahmad, N., & Irshad, S. (2021). Cefotaxime Loaded Polycaprolactone Based Polymeric Nanoparticles with Antifouling Properties for In-Vitro Drug Release Applications. *Polymers*, 13(2180), 1-16. <https://doi.org/10.3390/polym13132180>
- Jayram, J., Kondaveeti, S. S., Balu, A., Madhavan, Y., & Kalachaveedu, M. (2025). Polymer blended Acalypha indica bioactive for potential wound dressing applications through solvent casting – an experimental interrogation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(4), 4985-4997. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04667-y>
- Ji, M., Li, F., Li, J., Li, J., Wang, X., Zhang, C., Peng, S., & Man, J. (2024). Physical, antibacterial, blood coagulation, and healing promotion evaluations of chitosan derivative-based composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 278(134714), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134714>

- Jiang, Q., Zhou, W., Wang, J., Tang, R., Zhang, D., & Wang, X. (2016). Hypromellose succinate-crosslinked chitosan hydrogel films for potential wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.077>
- Jin, S. G., Kim, K. S., Kim, D. W., Kim, D. S., Seo, Y. G., Go, T. G., Youn, Y. S., Kim, J. O., Yong, C. S., & Choi, H. G. (2016). Development of a novel sodium fusidate-loaded triple polymer hydrogel wound dressing: Mechanical properties and effects on wound repair. *International Journal of Pharmaceutics*, 497, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.007>
- Jurgenliemk, G. and Nahrstedt, A. (2003). Dissolution, solubility and cooperativity of phenolic compounds from *Hypericum perforatum* L. in aqueous systems. *Pharmazie*, 58(3), 200-203. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12685814>
- Jürgens, C., Schulz, A. P., Porté, T., Faschingbauer, M., & Seide, K. (2006). Biodegradable Films in Trauma and Orthopedic Surgery. *European Journal of Trauma*, 32(2), 160-171. <https://doi.org/10.1007/s00068-006-6051-z>
- Jyothi, N. V., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 187-197. <https://doi.org/10.3109/02652040903131301>
- Kacerovská, D., Pizinger, K., Majer, F., & Šmíd, F. (2008). Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical hypericum perforatum extract—a pilot study. *Photochemistry and photobiology*, 84(3), 779-785. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00260.x>
- Kamoun, E. A., Kenawy, E. S., & Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, 8(3), 217-233. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>
- Karagül, Ş., Özel, D., Öztürk, İ., & Yurt, F. (2024). An in vitro evaluation of *Hypericum perforatum* loaded-chitosan nanoparticle/agarose film as a Wound dressing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 98(105873), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105873>
- Karatas, A., Sonakin, O., Kilicarslan, M., & Baykara, T. (2009). Poly (epsilon-caprolactone) microparticles containing Levobunolol HCl prepared by a multiple emulsion (W/O/W) solvent evaporation technique: effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *Journal of Microencapsulation*, 26(1), 63-74. <https://doi.org/10.1080/02652040802141039>
- Karatas, A., Sonakin, O., Kilicarslan, M., & Baykara, T. (2010). Effects Of Stirring Rate and Drug: Polymer Ratio On The Characteristics Of Levobunolol Hcl Loaded Poly (E-Caprolactone) Microparticle. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 225-236.
- Karavasili, C., Tsongas, K., Andreadis, II, Andriotis, E. G., Papachristou, E. T., Papi, R. M., Tzetzis, D., & Fatouros, D. G. (2020). Physico-mechanical and finite element analysis evaluation of 3D printable alginate-methylcellulose inks for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*, 247(116666), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116666>
- Kariduraganavar, M. Y., Kittur, A. A., & Kamble, R. R. (2014). Polymer Synthesis and Processing. In S. G. Kumbar, L. C.T., & M. Deng (Eds.), *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (ss. 1-31). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-396983-5.00001-6>
- Karki, S., Kim, H., Na, S.-J., Shin, D., Jo, K., & Lee, J. (2016). Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(5), 559-574. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004>
- Kasinathan, N., Amirthalingam, M., Reddy, N. D., Jagani, H. V., Volety, S. M., & Rao, J. V. (2016). In-situ implant containing PCL-curcumin nanoparticles developed using design of experiments. *Drug Delivery*, 23(3), 1017-1025. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.927021>

- Kaur, P., Gondil, V. S., & Chhibber, S. (2019). A novel wound dressing consisting of PVA-SA hybrid hydrogel membrane for topical delivery of bacteriophages and antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 572(118779), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118779>
- Kaya, S. and Doğan, Ş. (2022). Effect of Combination of Hypericum perforatum, Calendula officinalis and Aloe vera Plant Extracts on Incisional Wound Healing. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(3), 161-168. <https://doi.org/10.24998/maeusabed.1195179>
- Kepekçi, R. A., Yener İlçe, B., & Demir Kanmazalp, S. (2021). Plant-derived biomaterials for wound healing. In A.-u.-R. FRS (Ed.), *Bioactive Natural Products* (ss. 227-264). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819489-8.00001-6>
- Khaled, S. A., Burley, J. C., Alexander, M. R., & Roberts, C. J. (2014). Desktop 3D printing of controlled release pharmaceutical bilayer tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 461, 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.021>
- Khan, M. I., Islam, J. M., Kabir, W., Rahman, A., Mizan, M., Rahman, M. F., Amin, J., & Khan, M. A. (2016). Development of hydrocolloid Bi-layer dressing with bio-adhesive and non-adhesive properties. *Materials Science and Engineering C*, 69, 609-615. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.029>
- Khan, T., Peh, K., & Ch'ng, H. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 303-311. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11177648>
- Khayata, N., Abdelwahed, W., Chehna, M. F., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: from laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 419-427. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.016>
- Khoshmaram, K., Yazdian, F., Pazhouhnia, Z., & Lotfibakhshaiesh, N. (2024). Preparation and characterization of 3D bioprinted gelatin methacrylate hydrogel incorporated with curcumin loaded chitosan nanoparticles for in vivo wound healing application. *Biomaterials Advances*, 156(213677), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213677>
- Kilicarslan, M. and Gencel, C. N. (2020). İlaç üretiminde üç boyutlu baskı teknolojileri. In G. Özçelikay & İ. Yıldız (Eds.), *Eczacılıkta Yenilikler 3* (ss. 371-390). Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Kilicarslan, M., İlhan, M., Inal, O., & Orhan, K. (2018). Preparation and evaluation of clindamycin phosphate loaded chitosan/alginate polyelectrolyte complex film as mucoadhesive drug delivery system for periodontal therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 123, 441-451. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.007>
- Kılıçarslan, M., Büke, A. N., & Nekük, Ö. (2023). 3B baskı teknolojisi ve çok katmanlı farmasötik filmler. In A. Bozkır & İ. Yıldız (Eds.), *Eczacılıkta Yenilikler 4* (ss. 381-397). Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Kim, J. O., Park, J. K., Kim, J. H., Jin, S. G., Yong, C. S., Li, D. X., Choi, J. Y., Woo, J. S., Yoo, B. K., Lyoo, W. S., Kim, J. A., & Choi, H. G. (2008). Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. *International Journal of Pharmaceutics*, 359, 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.03.021>
- Kıyan, S., Uyanıkgil, Y., Altuncı, Y. A., Cavusoglu, T., Cetin Uyanıkgil, E. O., & Karabey, F. (2015). Investigation of acute effects of Hypericum perforatum (St. John's Wort-Kantaron) treatment in experimental thermal burns and comparison with silver sulfadiazine treatment. *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi*, 21(5), 323-336. <https://doi.org/10.5505/tjtes.2015>
- Kondo, S. and Kuroyanagi, Y. (2012). Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge with epidermal growth factor. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23(5), 629-643. <https://doi.org/10.1163/092050611X555687>

- Korzhikov, V., Averianov, I., Litvinchuk, E., & Tennikova, T. B. (2016). Polyester-based microparticles of different hydrophobicity: the patterns of lipophilic drug entrapment and release. *Journal of Microencapsulation*, 33(3), 199-208. <https://doi.org/10.3109/02652048.2016.1144818>
- Koseoglu, P. and Kolak, U. (2010). Determination of Boron in 18 Bottled Mineral Waters in Turkey. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 41, 28-32. <Go to ISI>://WOS:000439241500003
- Koyu, H. and Haznedaroglu, M. Z. (2015). Investigation of impact of storage conditions on Hypericum perforatum L. dried total extract. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 545-551. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.04.002>
- Kucuk, I. and Yıldırım, N. (2019). Sarı Kantaron (Hypericum perforatum) katkılı kitosan ve jelatin esaslı yara örtücü filmlerinin üretimi ve karakterizasyonu. *Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 35(1), 127-136. <https://doi.org/10.17341/gazimmfd.443639>
- Kulkarni, V. R., Saha, T., Raj Giri, B., Lu, A., Das, S. C., & Maniruzzaman, M. (2024). Recent Advancements in Pharmaceutical 3D Printing Industry. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 100(106072), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.106072>
- Kumar, A. and Sawant, K. (2013). Encapsulation of exemestane in polycaprolactone nanoparticles: optimization, characterization, and release kinetics. *Cancer Nanotechnology*, 4(4-5), 57-71. <https://doi.org/10.1007/s12645-013-0037-4>
- Kumar, A., Wang, X., Nune, K. C., & Misra, R. (2017). Biodegradable hydrogel-based biomaterials with high absorbent properties for non-adherent wound dressing. *International Wound Journal*, 14(6), 1076-1087. <https://doi.org/10.1111/iwj.12762>
- Kurt, A. A. and Aslan, İ. (2025). A Novel Liposomal In-Situ Hydrogel Formulation of Hypericum perforatum L.: In Vitro Characterization and In Vivo Wound Healing Studies. *Gels*, 11(165), 1-25. <https://doi.org/10.3390/gels11030165>
- Kurtoğlu, A. H. and Karataş, A. (2009). Yara tedavisinde güncel yaklaşımlar: modern yara örtüleri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 38(3), 211-232.
- Lappalainen, O. P., Karhula, S. S., Haapea, M., Kauppinen, S., Finnilä, M., Saarakkala, S., Serlo, W., & Sandor, G. K. (2016). Micro-CT Analysis of Bone Healing in Rabbit Calvarial Critical-Sized Defects with Solid Bioactive Glass, Tricalcium Phosphate Granules or Autogenous Bone. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 7(2), 1-8. <https://doi.org/10.5037/jomr.2016.7204>
- Lazaridou, M., Moroni, S., Klonos, P., Kyritsis, A., Bikiaris, D. N., & Lamprou, D. A. (2024). 3D-printed hydrogels based on amphiphilic chitosan derivative loaded with levofloxacin for wound healing applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 74(2), 67-84. <https://doi.org/10.1080/00914037.2024.2314610>
- Lecomte, F., Siepmann, J., Walther, M., MacRae, R. J., & Bodmeier, R. (2003). Blends of enteric and GIT-insoluble polymers used for film coating: physicochemical characterization and drug release patterns. *Journal of Controlled Release*, 89(3), 457-471. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(03\)00155-x](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(03)00155-x)
- Li, X., Chen, S., Zhang, B., Li, M., Diao, K., Zhang, Z., Li, J., Xu, Y., Wang, X., & Chen, H. (2012). In situ injectable nano-composite hydrogel composed of curcumin, N,O-carboxymethyl chitosan and oxidized alginate for wound healing application. *International Journal of Pharmaceutics*, 437, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.001>
- Liakos, I., Rizzello, L., Scurr, D. J., Pompa, P. P., Bayer, I. S., & Athanassiou, A. (2014). All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 463(2), 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.10.046>

- Liang, J., Wang, R., & Chen, R. (2019). The Impact of Cross-linking Mode on the Physical and Antimicrobial Properties of a Chitosan/Bacterial Cellulose Composite. *Polymers*, 11(491), 1-15. <https://doi.org/10.3390/polym11030491>
- Lima, A. M., Pizzol, C. D., Monteiro, F. B., Creczynski-Pasa, T. B., Andrade, G. P., Ribeiro, A. O., & Perussi, J. R. (2013). Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.05.010>
- Lin, T.-F., Huang, Y.-J., Liu, Y.-J., Peng, C.-M., Juan, C.-J., Yeh, S.-H., & Chou, R.-H. (2022). 3D-printed surgical wound dressing for prolonged 5-fluorouracil delivery from pluronic blending composites. *Materials Today Communications*, 33(104284), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104284>
- Liu, H., Wang, C., Li, C., Qin, Y., Wang, Z., Yang, F., Li, Z., & Wang, J. (2018). A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Advances*, 8(14), 7533-7549. <https://doi.org/10.1039/c7ra13510f>
- Liu, M., Wei, X., Zheng, Z., Li, Y., Li, M., Lin, J., & Yang, L. (2023). Recent Advances in Nano-Drug Delivery Systems for the Treatment of Diabetic Wound Healing. *International Journal of Nanomedicine*, 18, 1537-1560. <https://doi.org/10.2147/IJN.S395438>
- Long, J., Etxeberria, A. E., Nand, A. V., Bunt, C. R., Ray, S., & Seyfoddin, A. (2019). A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery. *Materials Science and Engineering C*, 104(109873), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109873>
- Lyles, J. T., Kim, A., Nelson, K., Bullard-Roberts, A. L., Hajdari, A., Mustafa, B., & Quave, C. L. (2017). The Chemical and Antibacterial Evaluation of St. John's Wort Oil Macerates Used in Kosovar Traditional Medicine. *Frontiers in Microbiology*, 8(1639), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01639>
- Martinez Rivas, C. J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Galindo Rodriguez, S. A., Roman, R. A., Fessi, H., & Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1), 66-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>
- Massella, D., Celasco, E., Salaun, F., Ferri, A., & Barresi, A. A. (2018). Overcoming the Limits of Flash Nanoprecipitation: Effective Loading of Hydrophilic Drug into Polymeric Nanoparticles with Controlled Structure. *Polymers*, 10(1092), 1-18. <https://doi.org/10.3390/polym10101092>
- Matoh, T., Akaike, R., & Kobayashi, M. (1997). A sensitive and convenient assay for boron in plant using chromotropic acid and HPLC. *Plant and Soil*, 192(1), 115-118. <https://doi.org/10.1023/A:1004228216749>
- Maver, T., Maver, U., Mostegel, F., Griesser, T., Spirk, S., Smrke, D. M., & Stana-Kleinschek, K. (2015). Cellulose based thin films as a platform for drug release studies to mimick wound dressing materials. *Cellulose*, 22(1), 749-761. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0515-9>
- Maver, T., Smrke, D. M., Kurecic, M., Gradisnik, L., Maver, U., & Kleinschek, K. S. (2018). Combining 3D printing and electrospinning for preparation of pain-relieving wound-dressing materials. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 88(1), 33-48. <https://doi.org/10.1007/s10971-018-4630-1>
- Mawazi, S. M., Kumar, M., Ahmad, N., Ge, Y., & Mahmood, S. (2024). Recent Applications of Chitosan and Its Derivatives in Antibacterial, Anticancer, Wound Healing, and Tissue Engineering Fields. *Polymers*, 16(1351), 1-34. <https://doi.org/10.3390/polym16101351>
- Meenatchi, V., Bhaskar, R., Sood, A., & Han, S. S. (2024). Preparation of β -cyclodextrin derivatives/metamizole inclusion complex nanofibers: Characterization, drug release, and wound scratch assay. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 97(105752), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2024.105752>

- Merino-Casallo, F., Gomez-Benito, M. J., Hervás-Raluy, S., & Garcia-Aznar, J. M. (2022). Unravelling cell migration: defining movement from the cell surface. *Cell Adhesion & Migration*, 16(1), 25-64. <https://doi.org/10.1080/19336918.2022.2055520>
- Michalowski, C. B., Guterres, S. S., & Dalla Costa, T. (2004). Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35(5), 1093-1100. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.04.002>
- Miguel, S. P., Cabral, C. S. D., Moreira, A. F., & Correia, I. J. (2019). Production and characterization of a novel asymmetric 3D printed construct aimed for skin tissue regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 994-1003. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.063>
- Milliken, R. L., Quinten, T., Andersen, S. K., & Lamprou, D. A. (2024). Application of 3D printing in early phase development of pharmaceutical solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 653(123902), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.123902>
- Mohammed, Y. I., Garba, K., & Umar, S. (2014). Analytical Determination of Boron in Irrigation Water Using Azomethine-H: Spectrophotometry. *Journal of Applied Chemistry*, 7(3), 47-51.
- Mojtahedi, F., Nasiri, M. R., Ali, S. N., Mohammadgholi, A., Mohebbi, S., Shahbazi, Z., Behfar, R., Namazifard, S., Noorbazargan, H., & Baghbani-Arani, F. (2025). Novel chitosan-alginate dressings with UIO-66-NH₂ nanoparticles and ferula gummosa extracts for effective wound healing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 719(137004), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2025.137004>
- Monou, P. K., Mamaligka, A. M., Tzimtzimis, E. K., Tzetzis, D., Vergkizi-Nikolakaki, S., Vizirianakis, I. S., Andriotis, E. G., Eleftheriadis, G. K., & Fatouros, D. G. (2022). Fabrication and Preliminary In Vitro Evaluation of 3D-Printed Alginate Films with Cannabidiol (CBD) and Cannabigerol (CBG) Nanoparticles for Potential Wound-Healing Applications. *Pharmaceutics*, 14(1637), 1-24. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081637>
- Monteiro, N., Martins, M., Martins, A., Fonseca, N. A., Moreira, J. N., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2015). Antibacterial activity of chitosan nanofiber meshes with liposomes immobilized releasing gentamicin. *Acta Biomaterialia*, 18, 196-205. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.018>
- Monteiro, R. T., Da Silva, T. F., de Souza Guedes, L., Moreira Filho, R. N. F., Soares, A. L. B., Vasconcelos, N. F., Andrade, F. K., & Vieira, R. S. (2024). Porous and Dense Alginate/Chitosan Composite Films Loaded with Simvastatin for Dressing Applications. *Coatings*, 14(278), 1-17. <https://doi.org/10.3390/coatings14030278>
- Moreira, T. D., Martins, V. B., da Silva Júnior, A. H., Sayer, C., de Araújo, P. H. H., & Immich, A. P. S. (2024). New insights into biomaterials for wound dressings and care: Challenges and trends. *Progress in Organic Coatings*, 187(108118), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2023.108118>
- Mortazavian, E., Dorkoosh, F. A., & Rafiee-Tehrani, M. (2014). Design, characterization and ex vivo evaluation of chitosan film integrating of insulin nanoparticles composed of thiolated chitosan derivative for buccal delivery of insulin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(5), 691-698. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.886590>
- Mortensen, T., Shen, S., Shen, F., Walsh, M. K., Sims, R. C., & Miller, C. D. (2012). Investigating the effectiveness of St John's wort herb as an antimicrobial agent against mycobacteria. *Phytotherapy Research*, 26(9), 1327-1333. <https://doi.org/10.1002/ptr.3716>
- Mouro, C., Gomes, A. P., & Gouveia, I. C. (2021). Double-layer PLLA/PEO Chitosan nanofibrous mats containing Hypericum perforatum L. as an effective approach for wound treatment. *Polymers for Advanced Technologies*, 32(4), 1493-1506. <https://doi.org/10.1002/pat.5185>

- Mouro, C., Gomes, A. P., & Gouveia, I. C. (2023). Emulsion Electrospinning of PLLA/PVA/Chitosan with *Hypericum perforatum* L. as an Antibacterial Nanofibrous Wound Dressing. *Gels*, 9(353), 1-17. <https://doi.org/10.3390/gels9050353>
- Muhtadi, W. K., Novitasari, L., Danarti, R., & Martien, R. (2020). Development of polymeric nanoparticle gel prepared with the combination of ionic pre-gelation and polyelectrolyte complexation as a novel drug delivery of timolol maleate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(11), 1844-1852. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1821053>
- Mutlu, B., Erci, F., & Çakir Koç, R. (2022). Production of alginate films containing *Hypericum perforatum* extract as an antibacterial and antioxidant wound dressing material. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 37(2), 134-148. <https://doi.org/10.1177/08839115211073155>
- Muwaffak, Z., Goyanes, A., Clark, V., Basit, A. W., Hilton, S. T., & Gaisford, S. (2017). Patient-specific 3D scanned and 3D printed antimicrobial polycaprolactone wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics*, 527, 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.077>
- Nafee, N., Youssef, A., El-Gowelli, H., Asem, H., & Kandil, S. (2013). Antibiotic-free nanotherapeutics: hypericin nanoparticles thereof for improved in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*, 454(1), 249-258. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.067>
- Nahrstedt, A. and Butterweck, V. (1997). Biologically Active and Other Chemical Constituents of the Herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 30, 129-134.
- Najafizadeh, P., Hashemian, F., Mansouri, P., Farshi, S., Surmaghi, M. S., & Chalangari, R. (2012). The evaluation of the clinical effect of topical St Johns wort (*Hypericum perforatum* L.) in plaque type psoriasis vulgaris: a pilot study. *Australasian Journal of Dermatology*, 53(2), 131-135. <https://doi.org/10.1111/j.1440-0960.2012.00877.x>
- Naseri-Nosar, M. and Ziora, Z. M. (2018). Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydrate Polymers*, 189, 379-398. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.003>
- Naseri, N., Algan, C., Jacobs, V., John, M., Oksman, K., & Mathew, A. P. (2014). Electrospun chitosan-based nanocomposite mats reinforced with chitin nanocrystals for wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 109, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.031>
- Nayak, S. B., Isik, K., & Marshall, J. R. (2017). Wound-Healing Potential of Oil of *Hypericum perforatum* in Excision Wounds of Male Sprague Dawley Rats. *Advances in Wound Care*, 6(12), 401-406. <https://doi.org/10.1089/wound.2017.0746>
- Negiz, H. and İlbasım Tamer, S. (2024). Preparation of Microneedles with 3D-Printing Methods: Traditional Review. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 13(3), 151-164. <https://doi.org/10.5336/pharmsci.2024-102966>
- Nguyen, H. M., Ngoc Le, T. T., Nguyen, A. T., Thien Le, H. N., & Pham, T. T. (2023). Biomedical materials for wound dressing: recent advances and applications. *RSC Advances*, 13(8), 5509-5528. <https://doi.org/10.1039/d2ra07673j>
- Nunes, P. S., Albuquerque, R. L., Jr., Cavalcante, D. R., Dantas, M. D., Cardoso, J. C., Bezerra, M. S., Souza, J. C., Serafini, M. R., Quitans, L. J., Jr., Bonjardim, L. R., & Araujo, A. A. (2011). Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2011/761593>
- Nunes, P. S., Rabelo, A. S., Souza, J. C., Santana, B. V., da Silva, T. M., Serafini, M. R., Dos Passos Menezes, P., Dos Santos Lima, B., Cardoso, J. C., Alves, J. C., Frank, L. A., Guterres, S. S., Pohlmann, A. R., Pinheiro, M. S., de Albuquerque, R. L. J., & Araujo, A. A. (2016). Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a

- porcine model. *International Journal of Pharmaceutics*, 513, 473-482. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.040>
- Nzietchueng, R. M., Dousset, B., Franck, P., Benderdour, M., Nabet, P., & Hess, K. (2002). Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 16(4), 239-244. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(02\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(02)80051-7)
- Okur, M. E., Karantas, I. D., Senyigit, Z., Ustundag Okur, N., & Siafaka, P. I. (2020). Recent trends on wound management: New therapeutic choices based on polymeric carriers. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(6), 661-684. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.008>
- Oliveira, A. I., Pinho, C., Fonte, P., Sarmiento, B., & Dias, A. C. P. (2018). Development, characterization, antioxidant and hepatoprotective properties of poly(E-caprolactone) nanoparticles loaded with a neuroprotective fraction of *Hypericum perforatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 185-196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.103>
- Oliveira, R. S., Fantaus, S. S., Guillot, A. J., Melero, A., & Beck, R. C. R. (2021). 3D-Printed Products for Topical Skin Applications: From Personalized Dressings to Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 13(1946), 1-39. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111946>
- Oliveira, S. G. A., da Silva, T. N., Cardoso, S. A., da Silva, F. F. F., de Carvalho Patricio, B. F., Goncalves, R. P., Weissmuller, G., El-Cheikh, M. C., Carneiro, K., & Barradas, T. N. (2024). Chitosan-based films filled with nanoencapsulated essential oil: Physical-chemical characterization and enhanced wound healing activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 261(129049), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.129049>
- Orhan, I. E., Kartal, M., Gulpinar, A. R., Cos, P., Matheeussen, A., Maes, L., & Tasdemir, D. (2013). Assessment of antimicrobial and antiprotozoal activity of the olive oil macerate samples of *Hypericum perforatum* and their LC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry*, 138, 870-875. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.053>
- Orhan, K. (2020). *Micro-computed Tomography (micro-CT) in Medicine and Engineering*. Springer.
- Oto, Ç. and Yılğör Huri, P. (2024). Biyobasım ve Preklinik Uygulamaları. In P. Yılğör Huri (Ed.), *Tıpta 3B Basım Uygulamaları* (ss. 58-63). Türkiye Klinikleri.
- Ozturk, K., Kaplan, M., & Calis, S. (2024). Effects of nanoparticle size, shape, and zeta potential on drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 666(124799), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124799>
- Ozturk, N., Korkmaz, S., & Ozturk, Y. (2007). Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.029>
- Özdemir, T. and Keskiner, A. Ü. (2018). Spectroscopic Analysis of the Boric Acid and Salicylic acid-Boric acid-Ethanol Solution. *Journal of Boron*, 3(2), 118-125. <https://doi.org/10.30728/boron.323874>
- Öztürk, E., Ağalar, C., Keçeci, K., & Denkba, E. B. (2006). Preparation and characterization of ciprofloxacin-loaded alginate/chitosan sponge as a wound dressing material. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(3), 1602-1609. <https://doi.org/10.1002/app.23563>
- Pagano, C., Ceccarini, M. R., Calarco, P., Scuota, S., Conte, C., Primavilla, S., Ricci, M., & Perioli, L. (2019). Bioadhesive polymeric films based on usnic acid for burn wound treatment: Antibacterial and cytotoxicity studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, 488-499. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.001>
- Pagano, C., Marinozzi, M., Baiocchi, C., Beccari, T., Calarco, P., Ceccarini, M. R., Chielli, M., Orabona, C., Orecchini, E., Ortenzi, R., Ricci, M., Scuota, S., Tiralti, M. C., & Perioli, L. (2020). Bioadhesive Polymeric Films Based on Red Onion Skins Extract for Wound Treatment: An

- Innovative and Eco-Friendly Formulation. *Molecules*, 25(318), 1-18. <https://doi.org/10.3390/molecules25020318>
- Parvez, S., Rahman, M. M., Khan, M. A., Khan, M. A. H., Islam, J. M. M., Ahmed, M., Rahman, M. F., & Ahmed, B. (2012). Preparation and characterization of artificial skin using chitosan and gelatin composites for potential biomedical application. *Polymer Bulletin*, 69(6), 715-731. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0761-7>
- Patel, P., Raval, M., Manvar, A., Airao, V., Bhatt, V., & Shah, P. (2022). Lung cancer targeting efficiency of Silibinin loaded Poly Caprolactone /Pluronic F68 Inhalable nanoparticles: In vitro and In vivo study. *PLoS One*, 17(5), 1-31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267257>
- Patil, N. and Wairkar, S. (2024). Chitosan and alpha-cellulose-based mupirocin topical film-forming spray: Optimization, in vitro characterization, antimicrobial studies and wound healing activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 254(127622), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127622>
- Pavan Kalyan, B., Mehrotra, S., Marques, S. M., Kumar, L., & Verma, R. (2023). 3D printing in personalized medicines: A focus on applications of the technology. *Materials Today Communications*, 35(105875), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.105875>
- Peles, Z., Binderman, I., Berdicevsky, I., & Zilberman, M. (2013). Soy protein films for wound-healing applications: antibiotic release, bacterial inhibition and cellular response. *Journal of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, 7(5), 401-412. <https://doi.org/10.1002/term.536>
- Pena, O. A. and Martin, P. (2024). Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(8), 599-616. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00715-1>
- Peng, Z. L. and Chen, S. H. (2011). Effects of surface roughness and film thickness on the adhesion of a bioinspired nanofilm. *Physical Review E—Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 83(051915), 1-8. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.83.051915>
- Penjweini, R., Deville, S., D'Olieslaeger, L., Berden, M., Ameloot, M., & Ethirajan, A. (2015). Intracellular localization and dynamics of Hypericin loaded PLLA nanocarriers by image correlation spectroscopy. *Journal of Controlled Release*, 218, 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.064>
- Penjweini, R., Deville, S., Haji Maghsoudi, O., Notelaers, K., Ethirajan, A., & Ameloot, M. (2019). Investigating the effect of poly-l-lactic acid nanoparticles carrying hypericin on the flow-biased diffusive motion of HeLa cell organelles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(1), 104-116. <https://doi.org/10.1111/jphp.12779>
- Pereira, P. C. D., Goncalves, R. S., Zampar, M. A., Montanha, M. C., de Moraes, F. A. P., Kimura, E., Nakamura, C. V., Bruschi, M. L., Hioka, N., & Caetano, W. (2020). Photosynthesis of hypericin in aqueous medium: A greener approach to prodrug strategy design in photodynamic therapy. *Journal of Molecular Liquids*, 304, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112746>
- Perez, M. H., Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Astier, A., Hoffman, M., Bodmeier, R., & Maincent, P. (2000). The preparation and evaluation of poly(e-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of controlled release*, 65(3), 429-438.
- Piperopoulos, G., Lotz, R., Wixforth, A., Schmierer, T., & Zeller, K. P. (1997). Determination of naphthodianthrone in plant extracts from *Hypericum perforatum* L. by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 695(2), 309-316. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(97\)00188-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(97)00188-6)
- Pohlmann, A. R., Mezzalana, G., Venturini, C. de, G., Cruz, L., Bernardi, A., Jager, E., Battastini, A. M., da Silveira, N. P., & Guterres, S. S. (2008). Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: a relation between

- light scattering and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, 359, 288-293. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.007>
- Pourhojat, F., Sohrabi, M., Shariati, S., Mahdavi, H., & Asadpour, L. (2016). Evaluation of poly ϵ -caprolactone electrospun nanofibers loaded with *Hypericum perforatum* extract as a wound dressing. *Research on Chemical Intermediates*, 43(1), 297-320. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2623-7>
- Prisacaru, A. I., Andritoiu, C. V., Andriescu, C., Havarneanu, E. C., Popa, M., Motoc, A. G., & Sava, A. (2013). Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 54(4), 1053-1059. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24399001>
- Radmanesh, S., Shabangiz, S., Koupaie, N., & Hassanzadeh-Tabrizi, S. A. (2022). 3D printed bio polymeric materials as a new perspective for wound dressing and skin tissue engineering applications: a review. *Journal of Polymer Research*, 29(50), 1-25. <https://doi.org/10.1007/s10965-022-02899-6>
- Rahman, H. S., Othman, H. H., Hammadi, N. I., Yeap, S. K., Amin, K. M., Abdul Samad, N., & Alitheen, N. B. (2020). Novel Drug Delivery Systems for Loading of Natural Plant Extracts and Their Biomedical Applications. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2439-2483. <https://doi.org/10.2147/IJN.S227805>
- Rajinikanth, B. S., Rajkumar, D. S. R., K, K., & Vijayaragavan, V. (2024). Chitosan-Based Biomaterial in Wound Healing: A Review. *Cureus*, 16(e55193), 1-18. <https://doi.org/10.7759/cureus.55193>
- Rampado, R. and Peer, D. (2023). Design of experiments in the optimization of nanoparticle-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 358, 398-419. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.05.001>
- Rao, R. M. and Aggarwal, S. K. (2008). Determination of boron at sub-ppm levels in uranium oxide and aluminum by hyphenated system of complex formation reaction and high-performance liquid chromatography (HPLC). *Talanta*, 75(2), 585-588. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.11.057>
- Reichling, J., Weseler, A., & Saller, R. (2001). A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 34 Suppl 1, S116-S118. <https://doi.org/10.1055/s-2001-15514>
- Reina-Romo, E., Mandal, S., Amorim, P., Bloemen, V., Ferraris, E., & Geris, L. (2021). Towards the Experimentally-Informed In Silico Nozzle Design Optimization for Extrusion-Based Bioprinting of Shear-Thinning Hydrogels. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(701778), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701778>
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2(1), 8-21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Repka, M. A., Gerding, T. G., Repka, S. L., & McGinity, J. W. (1999). Influence of plasticizers and drugs on the physical-mechanical properties of hydroxypropylcellulose films prepared by hot melt extrusion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(5), 625-633. <https://doi.org/10.1081/ddc-100102218>
- Reyes, G. C. and Koda, R. T. (2001). Development of a simple, rapid and reproducible HPLC assay for the simultaneous determination of hypericins and stabilized hyperforin in commercial St. John's Wort preparations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 26, 959-965.
- Ribeiro, A. F., de Oliveira Rezende, R. L., Cabral, L. M., & de Sousa, V. P. (2013). Poly epsilon-caprolactone nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa* extract: preparation, characterization, and optimization using the Box-Behnken design. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 431-442. <https://doi.org/10.2147/IJN.S38491>

- Richetta, A. G., Cantisani, C., Li, V. W., Mattozzi, C., Melis, L., De Gado, F., Giancristoforo, S., Silvestri, E., & Calvieri, S. (2011). Hydrofiber dressing and wound repair: review of the literature and new patents. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 5(2), 150-154. <https://doi.org/10.2174/187221311795399264>
- Roy, N., Saha, N., Kitano, T., & Saha, P. (2010). Development and Characterization of Novel Medicated Hydrogels for Wound Dressing. *Soft Materials*, 8(2), 130-148. <https://doi.org/10.1080/15394451003756282>
- Saddiqe, Z., Naeem, I., & Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(3), 511-521. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.034>
- Sadoun-Daikha, O., González Rodríguez, M. L., Azouz, L. H., Rabasco, A. M., & Rezgui, F. (2021). Central composite design optimization for a controlled valsartan release from polycaprolactone microspheres. *Journal of Applied Polymer Science*, 139(5), 1-16. <https://doi.org/10.1002/app.51584>
- Saghazadeh, S., Rinoldi, C., Schot, M., Kashaf, S. S., Sharifi, F., Jalilian, E., Nuutila, K., Giatsidis, G., Mostafalu, P., Derakhshandeh, H., Yue, K., Swieszkowski, W., Memic, A., Tamayol, A., & Khademhosseini, A. (2018). Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 127, 138-166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008>
- Sagiroglu, A. A., Celik, B., Guler, E. M., Kocyigit, A., & Ozer, O. (2021). Evaluation of wound healing potential of new composite liposomal films containing coenzyme Q10 and d-panthenyl triacetate as combinational treatment. *Pharmaceutical Development and Technology*, 26(4), 444-454. <https://doi.org/10.1080/10837450.2021.1887892>
- Sah, R. N. and Brown, P. H. (1997). Boron determination - A review of analytical methods. *Microchemical Journal*, 56(3), 285-304. <https://doi.org/DOI 10.1006/mchj.1997.1428>
- Saidaminov, M. I., Maksimova, N. V., & Avdeev, V. V. (2012). Expandable graphite modification by boric acid. *Journal of Materials Research*, 27(7), 1054-1059. <https://doi.org/10.1557/jmr.2012.39>
- Sakai, S., Yamamoto, S., Hirami, R., Hidaka, M., & Chamara Manoj Lakmal Elvitigala, K. (2024). Enzymatically gellable chitosan inks with enhanced printability by chitosan nanofibers for 3D printing of wound dressings. *European Polymer Journal*, 210(112960), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.112960>
- Salmon, P. L., Ohlsson, C., Shefelbine, S. J., & Doube, M. (2015). Structure Model Index Does Not Measure Rods and Plates in Trabecular Bone. *Frontiers in Endocrinology*, 6(162), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00162>
- Samadi, S., Khadivzadeh, T., Emami, A., Moosavi, N. S., Tafaghodi, M., & Behnam, H. R. (2010). The effect of Hypericum perforatum on the wound healing and scar of cesarean. *The Journal of Alternative And Complementary Medicine*, 16(1), 113-117. <https://doi.org/10.1089/acm.2009.0317>
- Sandri, G., Bonferoni, M. C., D'Autilia, F., Rossi, S., Ferrari, F., Grisoli, P., Sorrenti, M., Catenacci, L., Del Fante, C., Perotti, C., & Caramella, C. (2013). Wound dressings based on silver sulfadiazine solid lipid nanoparticles for tissue repairing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(1), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.11.022>
- Sannino, A., Demitri, C., & Madaghiele, M. (2009). Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. *Materials*, 2(2), 353-373. <https://doi.org/10.3390/ma2020353>
- Sarkar, D. J. and Singh, A. (2018). pH-triggered Release of Boron and Thiamethoxam from Boric Acid Crosslinked Carboxymethyl Cellulose Hydrogel Based Formulations. *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 58(1), 83-96. <https://doi.org/10.1080/03602559.2018.1466165>

- Sasikala, L., Rathinamoorthy, R., & Dhurai, B. (2018). Optimization of process conditions for chitosan-manuka honey film as wound contact layer for wound dressings. *Wound Medicine*, 23, 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2018.09.007>
- Sathyamoorthy, N., Magharla, D., Chintamaneni, P., & Vankayalu, S. (2017). Optimization of paclitaxel loaded poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles using Box Behnken design. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(4), 362-373. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.06.002>
- Saxena, V., Sadoqi, M., & Shao, J. (2004). Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 74(1), 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.01.002>
- Sayin, Z., Ucan, U. S., & Sakmanoglu, A. (2016). Antibacterial and Antibiofilm Effects of Boron on Different Bacteria. *Biological Trace Element Research*, 173(1), 241-246. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0637-z>
- Schmitt, L. A., Liu, Y., Murphy, P. A., Petrich, J. W., Dixon, P. M., & Birt, D. F. (2006). Reduction in hypericin-induced phototoxicity by Hypericum perforatum extracts and pure compounds. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 85(2), 118-130. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.06.001>
- Sen, C. K. (2023). Human Wound and Its Burden: Updated 2022 Compendium of Estimates. *Advances in Wound Care*, 12(12), 657-670. <https://doi.org/10.1089/wound.2023.0150>
- Seoane-Viano, I., Januskaite, P., Alvarez-Lorenzo, C., Basit, A. W., & Goyanes, A. (2021). Semi-solid extrusion 3D printing in drug delivery and biomedicine: Personalised solutions for healthcare challenges. *Journal of Controlled Release*, 332, 367-389. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.027>
- Seok, J. M., Oh, S. H., Lee, S. J., Lee, J. H., Kim, W. D., Park, S. H., Nam, S. Y., Shin, H., & Park, S. A. (2019). Fabrication and characterization of 3D scaffolds made from blends of sodium alginate and poly(vinyl alcohol). *Materials Today Communications*, 19, 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2018.09.013>
- Seyhan, N. (2020). Evaluation of the Healing Effects of Hypericum perforatum and Curcumin on Burn Wounds in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(6462956), 1-5. <https://doi.org/10.1155/2020/6462956>
- Shi, G., Wang, Y., Derakhshanfar, S., Xu, K., Zhong, W., Luo, G., Liu, T., Wang, Y., Wu, J., & Xing, M. (2019). Biomimicry of oil infused layer on 3D printed poly(dimethylsiloxane): Non-fouling, antibacterial and promoting infected wound healing. *Materials Science and Engineering C*, 100, 915-927. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.058>
- Sibbald, R. G., Goodman, L., & Reneeka, P. (2013). Wound bed preparation 2012. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 17, S12-S22. <https://doi.org/10.2310/7750.2013.wound5>
- Simoes, D., Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Coutinho, P., Mendonca, A. G., & Correia, I. J. (2018). Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>
- Singh, B. and Pal, L. (2012). Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 9, 9-21. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.01.021>
- Singh, T. P., Chatli, M. K., & Sahoo, J. (2015). Development of chitosan based edible films: process optimization using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2530-2543. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1318-6>

- Sohrabi, S., Haeri, A., Mahboubi, A., Mortazavi, A., & Dadashzadeh, S. (2016). Chitosan gel-embedded moxifloxacin niosomes: An efficient antimicrobial hybrid system for burn infection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 625-633. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.013>
- Son, G.-H., Lee, B.-J., & Cho, C.-W. (2017). Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 47(4), 287-296. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0320-1>
- Soriano-Ursua, M. A., Das, B. C., & Trujillo-Ferrara, J. G. (2014). Boron-containing compounds: chemico-biological properties and expanding medicinal potential in prevention, diagnosis and therapy. *Expert Opinion*, 24(5), 485-500. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.881472>
- Soriano-Ursúa, M. A., Martínez-Archundia, M., Kilic, A., Pérez-Capistran, T., Hernández-Zamora, M. A., López-Ramos, J. E., & Farfán-García, E. D. (2025). Formulations with Boric Acid or Aryl-Organoboron Compounds for Treating Diabetic Foot Ulcers. *Scientia Pharmaceutica*, 93(14), 1-16. <https://doi.org/10.3390/scipharm93010014>
- Stoilkovska, V., Acevska, J., & Stefkov, G. (2016). HPLC determination of hypericin content in Hyperici oleum. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 62, 631-632.
- Sung, J. H., Hwang, M. R., Kim, J. O., Lee, J. H., Kim, Y. I., Kim, J. H., Chang, S. W., Jin, S. G., Kim, J. A., Lyoo, W. S., Han, S. S., Ku, S. K., Yong, C. S., & Choi, H. G. (2010). Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 392, 232-240. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.024>
- Suntar, I. P., Akkol, E. K., Keles, H., Oktem, A., Baser, K. H., & Yesilada, E. (2011). A novel wound healing ointment: a formulation of Hypericum perforatum oil and sage and oregano essential oils based on traditional Turkish knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(1), 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.061>
- Suntar, I. P., Akkol, E. K., Yilmazer, D., Baykal, T., Kirmizibekmez, H., Alper, M., & Yesilada, E. (2010). Investigations on the in vivo wound healing potential of Hypericum perforatum L. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 468-477. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.011>
- Sut, S., Dall'Acqua, S., Zengin, G., Senkardes, I., Uba, A. I., Bouyahya, A., & Aktumsek, A. (2023). Novel Signposts on the Road from Natural Sources to Pharmaceutical Applications: A Combinative Approach between LC-DAD-MS and Offline LC-NMR for the Biochemical Characterization of Two Hypericum Species (*H. montbretii* and *H. origanifolium*). *Plants*, 12(648), 1-25. <https://doi.org/10.3390/plants12030648>
- Şen, Ö., Emanet, M., & Çulha, M. (2019). Stimulatory Effect of Hexagonal Boron Nitrides in Wound Healing. *American Chemical Society Applied Bio Materials*, 2(12), 5582-5596. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00669>
- Tandara, A. A. and Mustoe, T. A. (2004). Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World Journal of Surgery*, 28(3), 294-300. <https://doi.org/10.1007/s00268-003-7400-2>
- Tao, X., Wang, Z., Ren, B., Li, J., Zhou, T., Tan, H., & Niu, X. (2024). High-flexible chitosan-based composite membrane with multi-layer biopolymer coatings for anti-bacterial drug delivery and wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 279(134829), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134829>
- Tavares Luiz, M., Santos Rosa Viegas, J., Palma Abriata, J., Viegas, F., Testa Moura de Carvalho Vicentini, F., Lopes Badra Bentley, M. V., Chorilli, M., Maldonado Marchetti, J., & Tapia-Blacido, D. R. (2021). Design of experiments (DoE) to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 165, 127-148. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.011>

- Tavli, Ö. F., Hazman, Ö., Büyükben, A., Yilmaz, F. N., Özbek Çelik, B., & Eroğlu Özkan, E. (2020). Pharmacognostic Research on Hypericum Perforatum Samples Sold by Herbalists in Istanbul. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(2), 265-280. <https://doi.org/10.33483/jfpau.686546>
- Teixeira, A., Sarria, M. P., Pinto, I., Espina, B., Gomes, A. C., & Dias, A. C. P. (2022). Protection against Paraquat-Induced Oxidative Stress by Curcuma longa Extract-Loaded Polymeric Nanoparticles in Zebrafish Embryos. *Polymers*, 14(3773), 1-16. <https://doi.org/10.3390/polym14183773>
- Teoh, J. H., Tay, S. M., Fuh, J., & Wang, C.-H. (2022). Fabricating scalable, personalized wound dressings with customizable drug loadings via 3D printing. *Journal of Controlled Release*, 341, 80-94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.11.017>
- Thakhiew, W., Devahastin, S., & Soponronnarit, S. (2010). Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. *Journal of Food Engineering*, 99(2), 216-224. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.02.025>
- Tiwari, N., Kumar, D., Priyadarshani, A., Jain, G. K., Mittal, G., Kesharwani, P., & Aggarwal, G. (2023). Recent progress in polymeric biomaterials and their potential applications in skin regeneration and wound care management. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 82(104319), 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104319>
- Topuz, P. (2016). DIN 1.2842 çeliğinin borlanması ile oluşan borür tabakası üzerine borlama sıcaklık ve süresinin etkileri. *Bor Dergisi*, 1(1), 15-19.
- Tort, S., Acartürk, F., & Besikci, A. (2017). Evaluation of three-layered doxycycline-collagen loaded nanofiber wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 529, 642-653. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.027>
- Tort, S. and Acartürk, F. (2015). Wound Healing and Electrospun Wound Dressings: Review. *Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences*, 4(2), 68-78. <https://doi.org/10.5336/pharmsci.2015-45768>
- Tran, T. T., Tran, P. H., Nguyen, K. T., & Tran, V. T. (2016). Nano-Precipitation: Preparation and Application in the Field of Pharmacy. *Current Pharmaceutical Design*, 22, 2997-3006. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160408151702>
- Uehara, N., Yamaguchi, K., & Shimizu, T. (2001). Determination of Trace Amounts of Boron in Steel by Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography with Azomethine-H as a Precolumn Derivatization Agent. *Analytical sciences*, 17(12), 1421-1424.
- Ulubayram, K., Nur Çakar, A., Korkusuz, P., Ertan, C., & Hasirci, N. (2001). EGF containing gelatin-based wound dressings. *Biomaterials*, 22(11), 1345-1356. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00287-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00287-8)
- USP44. (2021). *The United States Pharmacopeia*. United States Pharmacopeial Convention, Incorporated. <https://books.google.com.tr/books?id=MxBtAAAAMAAJ>
- Uzun, M., Anand, S. C., & Shah, T. (2013). In Vitro Characterisation and Evaluation of Different Types of Wound Dressing Materials. *Journal of Biomedical Engineering and Technology*, 1(1), 1-7. <https://doi.org/10.12691/jbet-1-1-1>
- Uzunhisarcikli, E. and Yerer, M. B. (2022). Role of Hypericum perforatum oil and pomegranate seed oil in wound healing: an in vitro study. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 77(5-6), 189-195. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0301>
- Vlachou, M., Siamidi, A., & Protopapa, C. (2025). 3D-printing technologies for pharmaceutical applications. In D. A. Lamprou (Ed.), *Fundamentals and Future Trends of 3D Printing in Drug Delivery* (ss. 29-46). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-23645-7.00002-7>

- Vujanovic, S. and Vujanovic, J. (2013). Bioresources in the pharmacotherapy and healing of burns: A mini-review. *Burns*, 39(6), 1031-1038. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2013.03.016>
- Wang, F., Zhang, W., Li, H., Chen, X., Feng, S., & Mei, Z. (2022). How Effective are Nano-Based Dressings in Diabetic Wound Healing? A Comprehensive Review of Literature. *International Journal of Nanomedicine*, 17, 2097-2119. <https://doi.org/10.2147/IJN.S361282>
- Wang, H. K., Wang, Y. X., Xue, C. B., Li, Z. M., Huang, J., Zhao, Y. H., Yang, Y. M., & Gu, X. S. (2016). Angiogenesis in tissue-engineered nerves evaluated objectively using MICROFIL perfusion and micro-CT scanning. *Neural Regeneration Research*, 11(1), 168-173. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.175065>
- Wang, J., Wen, Z., Xu, Y., Ning, X., Wang, D., Cao, J., & Feng, Y. (2023). Procedural Promotion of Wound Healing by Graphene-Barium Titanate Nanosystem with White Light Irradiation. *International Journal of Nanomedicine*, 18, 4507-4520. <https://doi.org/10.2147/IJN.S408981>
- Wang, K., Qi, Z., Pan, S., Zheng, S., Wang, H., Chang, Y., Li, H., Xue, P., Yang, X., & Fu, C. (2020). Preparation, characterization and evaluation of a new film based on chitosan, arginine and gold nanoparticle derivatives for wound-healing efficacy. *RSC Advances*, 10(35), 20886-20899. <https://doi.org/10.1039/d0ra03704d>
- Wang, S., Xiong, Y., Chen, J., Ghanem, A., Wang, Y., Yang, J., & Sun, B. (2019). Three Dimensional Printing Bilayer Membrane Scaffold Promotes Wound Healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(348), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00348>
- Wang, W., Lu, K. J., Yu, C. H., Huang, Q. L., & Du, Y. Z. (2019). Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(82), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0514-y>
- Wathoni, N., Motoyama, K., Higashi, T., Okajima, M., Kaneko, T., & Arima, H. (2016). Physically crosslinked-sacran hydrogel films for wound dressing application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 465-470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.006>
- Wolfe, U., Seelinger, G., & Schempp, C. M. (2014). Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica*, 80, 109-120. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1351019>
- Wong, R. S., Ashton, M., & Dodou, K. (2015). Effect of Crosslinking Agent Concentration on the Properties of Unmedicated Hydrogels. *Pharmaceutics*, 7(3), 305-319. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7030305>
- Wu, Q. H., Maire, M., Lerouge, S., Theriault, D., & Heuzey, M. C. (2017). 3D Printing of Microstructured and Stretchable Chitosan Hydrogel for Guided Cell Growth. *Advanced Biosystems*, 1(6), 1-6. <https://doi.org/10.1002/adbi.201700058>
- Wu, Y., Jiang, X., Chen, J., Qi, Y., Zhang, Y., Fu, H., Zheng, J., & Li, X. (2017). Boric acid-destabilized lithium borohydride with a 5.6 wt% dehydrogenation capacity at moderate temperatures. *Dalton Transactions*, 46(14), 4499-4503. <https://doi.org/10.1039/c7dt00337d>
- Yadollah-Damavandi, S., Chavoshi-Nejad, M., Jangholi, E., Nekouyian, N., Hosseini, S., Seifae, A., Rafiee, S., Karimi, H., Ashkani-Esfahani, S., Parsa, Y., & Mohsenikia, M. (2015). Topical *Hypericum perforatum* Improves Tissue Regeneration in Full-Thickness Excisional Wounds in Diabetic Rat Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-4. <https://doi.org/10.1155/2015/245328>
- Yalcinkaya, E., Basaran, M. M., Tunckasik, M. E., Yazici, G. N., Elmas, C., & Kocaturk, S. (2022). Efficiency of hypericum perforatum, povidone iodine, tincture benzoin and tretinoin on wound healing. *Food and Chemical Toxicology*, 166(113209), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113209>
- Yang, Y., Wang, X., Li, Y., Yang, F., Liu, X., & Wang, A. (2024). Dencichine/palygorskite nanocomposite incorporated chitosan/polyvinylpyrrolidone film for accelerating wound

- hemostasis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 275(133399), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133399>
- Yılğör Huri, P. and Oto, Ç. (2022). 3D Printing in Veterinary Medicine. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 69, 111-117. <https://doi.org/10.33988/auvfd.871913>
- Youssef, T., Fadel, M., Fahmy, R., & Kassab, K. (2012). Evaluation of hypericin-loaded solid lipid nanoparticles: physicochemical properties, photostability and phototoxicity. *Pharmaceutical Development and Technology*, 17(2), 177-186. <https://doi.org/10.3109/10837450.2010.529148>
- Yu, I., Kaonis, S., & Chen, R. (2017). A study on degradation behavior of 3D printed gellan gum scaffolds. *Procedia CIRP*, 65, 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2017.04.020>
- Yucel, A., Kan, Y., Yesilada, E., & Akin, O. (2017). Effect of St.John's wort (*Hypericum perforatum*) oily extract for the care and treatment of pressure sores; a case report. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 236-241. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.030>
- Zaman, H. U., Islam, J. M., Khan, M. A., & Khan, R. A. (2011). Physico-mechanical properties of wound dressing material and its biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7), 1369-1375. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.05.007>
- Zanchetta, F. C., De Wever, P., Morari, J., Gaspar, R. C., Prado, T. P. D., De Maeseneer, T., Cardinaels, R., Araujo, E. P., Lima, M. H. M., & Fardim, P. (2024). In Vitro and In Vivo Evaluation of Chitosan/HPMC/Insulin Hydrogel for Wound Healing Applications. *Bioengineering*, 11(2), 1-16. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11020168>
- Zeisser-Labouebe, M., Lange, N., Gurny, R., & Delie, F. (2006). Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 326, 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.012>
- Zelenkova, T., Fissore, D., Marchisio, D. L., & Barresi, A. A. (2014). Size control in production and freeze-drying of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(6), 1839-1850. <https://doi.org/10.1002/jps.23960>
- Zepon, K. M., Martins, M. M., Marques, M. S., Heckler, J. M., Dal Pont Morisso, F., Moreira, M. G., Ziulkoski, A. L., & Kanis, L. A. (2019). Smart wound dressing based on kappa-carrageenan/locust bean gum/cranberry extract for monitoring bacterial infections. *Carbohydrate Polymers*, 206, 362-370. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.014>
- Zhang, J., Gao, L., Hu, J., Wang, C., Hagedoorn, P.-L., Li, N., & Zhou, X. (2020). Hypericin: Source, Determination, Separation, and Properties. *Separation & Purification Reviews*, 51(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/15422119.2020.1797792>
- Zhang, J. Y., Shen, Z. G., Zhong, J., Hu, T. T., Chen, J. F., Ma, Z. Q., & Yun, J. (2006). Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, 323, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.048>
- Zoghi, N., Fouani, M. H., Bagheri, H., Nikkhah, M., & Asadi, N. (2021). Characterization of minocycline loaded chitosan/polyethylene glycol/glycerol blend films as antibacterial wound dressings. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(50781), 1-13. <https://doi.org/10.1002/app.50781>

EKLER

Ek 1. Hayvan Deneyi Yerel Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 19/01/2022
TOPLANTI NO : 2022-2
DOSYA NO : 2022-3
KARAR NO : 2022-2-17

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN'ın yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Çağdaş OTO, Prof. Dr. Pınar YILGÖR HURİ, Prof. Dr. Kaan ORHAN ve Ecz. Ayşe Nur BÜKE'nin katıldığı "Hypericum perforatum yüklü nanopartikül ve bor içeren yara örtüsü formülasyonlarının üç boyutlu yazıcı ile üretimi ve in vitro-in vivo araştırılması" başlıklı çalışma Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre değerlendirilmiş ve çalışmanın aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 90
Geçerlilik Süresi : 01/03/2022-01/03/2025

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YIĞIT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan/ANKARA Telefon : 0 (312) 60 40 / 2183 Faks : 0 (312) 212 60 49

Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K
Doç. Dr. Neşe Nuray TOPRAK (Üye)	Yemler ve Hayvan Besleme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K

Ek 2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

	
ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu
DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI	
Sayın AYŞE NUR BÜKE	
02.09.2019 - 10.09.2019 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi HADYEK tarafından Ankara İlinde düzenlenen “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.	
Prof. Dr. Mehmet Taner KARAOĞLU HADYEK Başkanı	Prof. Dr. Erkan İBİŞ Rektör
	



Ders Adı	Ders Saati	
	Teorik	Uygulama
Hayvan deneyleri mevzuatı*	1	-
Hayvan deneyleri etiği ve 3R*	2	-
Hayvan davranışı ve refahı*	2	-
Deney hayvanlarının karşılaştırmalı anatomisi	2	2
Deney hayvanlarının fizyolojisi	1	1
Deney hayvanlarının histolojisi	1	1
Deney hayvanlarının biyokimyası	1	-
Kan ve örnek alma teknikleri	1	4
Tutuş teknikleri	1	4
İlaç verme ve enjeksiyon teknikleri	1	4
Anestezi teknikleri	1	2
Ötanazi teknikleri	1	2
Ağrı, sıkıntı ve insani sonlandırma noktalarının belirlenmesi	1	-
Laboratuvar işleyişi (temizlik, güvenlik)*	2	1
Hayvan tesis/ünitelerinde iş sağlığı ve güvenliği*	1	-
Deney hayvanlarının beslenmesi	2	-
Hayvan hastalıkları	3	2
Biyostatistik*	4	-
Standardizasyon	2	-
Hayvan deneyi modeli kavramı ve spesifik deney modelleri	2	2
Hayvan deneylerinin tasarlanması*	2	4
Temel cerrahi	2	4
Deney hayvanlarının üretimi, yetiştirilmesi ve barındırılması	2	2
Alternatif yöntemler*	2	-
TOPLAM	40	35

*: Hayvan grubuna özgü olmayan dersler

Başarı Puanı : 87

Sertifikanın geçerli olduğu hayvan grubu/grupları : 1.Grup: Kemirgenler (fare, sıçan, kobay, hamster türleri, gerbil) ve tavşan

Bu Sertifika Tarım ve Orman ve Bakanlığı'nın 02.04.2019 tarih ve 2019/3 sayılı Genelgesine uygun olarak düzenlenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Nur BÜKE

1. Öğrenim Durumu

Doktora : 2018- (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)

Lisans : 2011-2016 (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)

Lise : 2011-2007 (Gerede Anadolu Öğretmen Lisesi)

2. Unvanlar

Eczacı /2016-

3. Mesleki Deneyim

Eczacı Mesul Müdür, Özel Dr. Bayram Öztürk Hastanesi, 2017-2017

Yardımcı Asistan, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, (100/2000 YÖK Doktora Programı, Bursiyer) 2018-2022

4. Yayınları

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Kilicarslan, M. and **Buke, A. N.**, An Overview: The Evaluation of Formation Mechanisms, Preparation Techniques and Chemical and Analytical Characterization Methods of the In Situ Forming Implants, Current Pharmaceutical Analysis, 2021, 17(3): 375-408.

2. **Buke, A. N.** ve Kılıçarslan, M. (2025). Yara Örtülerinde Güncel Teknolojiler ve Farmasötik Karakterizasyon Yöntemleri. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 49(2), 25-25. <https://doi.org/10.33483/jfpau.1625859>

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

1. **Buke, A. N.**, Kilicarslan, M., Hindy, O. A., Huri, P. Y. (2023). The effect of plasticizers and crosslinking on the printability, structural properties and release behaviour of boric acid-loaded chitosan films prepared by 3D printing. Macedonian Pharmaceutical Bulletin, 69 (Suppl 1) 109 – 110. 14th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (September 28-30, 2023), Ohrid, North Macedonia. (Tam metin-Sözlü bildiri).

2. **Buke, A. N.**, Kilicarslan, M. (2023). Investigation of the effects of stirring rate and surfactant concentration on in vitro characterization of Hypericum perforatum extract loaded polycaprolactone particles. Macedonian pharmaceutical bulletin, 69 (Suppl 1) 67 – 68. Poster bildiri, 14th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (September 28-30, 2023), Ohrid, North Macedonia. (Tam metin-Poster bildiri).

3. **Buke, A. N.**, Kilicarslan, M., Aslan Erdem, S. (2023). Determination of The Dissolution of Hypericin From Polymeric Nanoparticles by HPLC Analysis, 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2023), YS 29 , 89-92, 02-06 July 2023, Ankara University, Türkiye, (Tam metin-Sözlü bildiri).

4. **Büke A. N.**, Kılıçarslan M., Yılğör Huri P., Orhan K. (2024). The Effect of Infill Pattern Design and Amount of Boric Acid on 3D Printed Chitosan Films. 14th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-14) (July 25-28,2024), Ankara, Türkiye, (Özet metin-Sözlü bildiri).

5. Denizhan D., **Büke A. N.**, Kılıçarslan M. (2024). The Effect Of Combined Polymer Usage and Number of Layers on The Characterization of 3D Printed Metronidazole-Loaded Periodontal Films. 14th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-14), (July 25-28,2024), Ankara, Türkiye, (Özet metin-Poster bildiri).

6. Denizhan D., **Büke A. N.**, Kılıçarslan M. (2024). Comparison of Metronidazole-Loaded Alginate-Chitosan Polyelectrolyte Complex Film and Layered Films Prepared by 3D Printing. 21st International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS-21), (September 9-11,2024), Ankara, Türkiye, (Tam metin-Poster bildiri).

7. **Büke A. N.**, Kılıçarslan M. (2024). The effects of formulation variables on the characteristics of Hypericum perforatum extract loaded polycaprolactone particles. 10th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences (BBBB-10), (September 12-14, 2024), Tartu, Estonya, (Tam metin-Sözlü Bildiri).

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplar veya kitaplardaki bölümler:

1. Kılıçarslan, M., **Büke, A. N.**, Nekük, Ö. (2023). “3B Baskı Teknolojisi ve Çok Katmanlı Farmasötik Filmler”. Eczacılıkta Yenilikler-4. Ed. Bozkır A ve Yıldız İ. Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi, Yayın No: 841, 381-397 ISBN: 978-605-136-748-4.

2. **Büke A. N.**, Kılıçarslan M. 3B basım ile kişiselleştirilmiş ilaç üretimi. Yılğör Huri P, editör. Tıpta 3B Basım Uygulamaları. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2024. p.80-5 ISBN: 978-625-395-418-5.