

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

**HERPES SİMPEKS ENFEKSİYONUNUN TOPIKAL YOLLA
TEDAVİSİNE YÖNELİK ASİKLOVİR YÜKLÜ
KİTOSAN/POLİAKRİLİK ASİT FİLM FORMÜLASYONLARI
HAZIRLANMASI VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Berat ÜRGÜPLÜ

**Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2024

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

**HERPES SİMPEKS ENFEKSİYONUNUN TOPIKAL YOLLA
TEDAVİSİNE YÖNELİK ASİKLOVİR YÜKLÜ
KİTOSAN/POLİAKRİLİK ASİT FİLM FORMÜLASYONLARI
HAZIRLANMASI VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Berat ÜRGÜPLÜ

**Farmasötik Teknoloji Lisans Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Nazlı ERDOĞDU**

**ANKARA
2024**

**HERPES SİMPLİKS ENFEKSİYONUNUN TOPIKAL YOLLA
TEDAVİSİNE YÖNELİK ASİKLOVİR YÜKLÜ
KİTOSAN/POLİAKRİLİK ASİT FİLM FORMÜLASYONLARI
HAZIRLANMASI VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Öğrenci: Berat ÜRGÜPLÜ

Danışman: Doç. Dr. Nazlı ERDOĞDU

Bu tez çalışması 15 Ağustos 2024 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Teknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Doç. Dr. Kıvılcım SEYHUN*

Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Doç. Dr. Nazlı ERDOĞDU*

Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Dilara ÖRGÜL*

Selçuk Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

20 Eylül 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

15/08/2024
Ecz. Berat Ürgüplü

i

ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Nazlı ERDOĞDU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)

Ecz. Berat ÜRGÜPLÜ

TEŞEKKÜR

Ders ve tez dönemim boyunca her konuda bilimsel ve manevi desteğiyle yanımda olan kıymetli danışman hocam sayın Doç. Dr. Nazlı Erdoğan'ya,

Karakterizasyon çalışmalarındaki yardımları, özverisi ve manevi desteği için Dr. Öğr. Üyesi Dilara Örgül'e,

Bilimsel konulardaki yardımları ve manevi desteği için Prof. Dr. Emirhan Nemutlu'ya,

Laboratuvarda ihtiyaç duyduğum her an desteklerini esirgemeyen Ecz. Betül Gür'e,

Eğitimim boyunca katkıları için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma,

Manevi destekleri için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğrenci arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda hissettiğim ve her konuda beni sonuna kadar destekleyen aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Ürgüplü, B. Herpes Simpleks Enfeksiyonunun Topikal Yolla Tedavisine Yönelik Asiklovir Yüklü Kitosan/Poliakrilik Asit Film Formülasyonları Hazırlanması ve İn Vitro Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2024. Herpes simpleks virüsü, HSV-1 ve HSV-2 olarak 2 türü bulunan, nüfusun yaklaşık %90'ının 40 yaşına kadar enfekte olduğu bilinen oldukça yaygın bir hastalıktır. Enfeksiyon, vücut sıvılarıyla veya doğrudan temas ile kolaylıkla bulaşabilmektedir. Genellikle ilk bulaş sonrası belirti vermemekle beraber bağışıklık sisteminin baskılanması ile genellikle ağız, dudak ve genital bölgede karakteristik lezyonlar ile kendini göstermektedir. Virüsün enfeksiyon bölgesine bağlı olarak sistematik veya lokal tedavi uygulanmaktadır. HSV'nin oral tedavisinde asiklovir, famsiklovir ve valasiklovir tercih edilmekle birlikte topikal tedavide en yaygın olarak Asiklovir içeren krem formülasyonları kullanılmaktadır. Özellikle Asiklovir'in düşük biyoyararlanımı, düşük permeabilitesi ve kısa yarılanma ömrü (3 saat) nedeniyle topikal uygulama uzun süreli ve sık tekrarlı olmaktadır. Tedavide görülen bu sıkıntıların üstesinden gelmek ve hasta uyuncunu arttırmak için yenilikçi tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada hazırlanan topikal adhezif film formülasyonları ile Asiklovirin mukoza ile etkileşiminin artırılması ve ilaç salımının uzatılması sağlanarak doz azaltılacak ve hasta uyuncu artırılabilecektir. Kullanılan biyoadeziv polimerler olan kitosan ve poliakrilik asit ile asiklovirin penetrasyon özelliklerinin ve deriden geçişinin artırılması ile mukozanın derinliklerine ilacın ulaşması sağlanacaktır. Yapılan in vitro karakterizasyon çalışmaları sonucunda Asiklovir yüklü kitosan/poliakrilik Asit film formülasyonlarının Herpes Simpleks'in topikal yolla tedavisi için umut vaat eden sistemler olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Asiklovir, topikal, film, kitosan, poliakrilik asit.

Destekleyen Kurumlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 20856 numaralı Hızlı Destek Projesi

ABSTRACT

Ürgüplü, B., Preparation And In Vitro Evaluation of Acyclovir Loaded Chitosan/Polyacrylic Acid Film Formulations For Topical Treatment of Herpes Simplex Infection, Master's Thesis, Pharmaceutical Technology Program, Graduate School of Health Sciences, Hacettepe University, Ankara, 2024.

Herpes simplex virus is a very common disease with 2 types as HSV-1 and HSV -2, approximately 90% of which are known to be prevalent until 40 years of age. The infection can be transmitted through body fluids or direct contact. It usually presents with lesions in the mouth, lips and genital area with suppression of the immune system after the typical initial infection. Systemic or local treatment depending on the regimen of the virus. Acyclovir, famciclovir and valacyclovir are preferred in oral treatment of HSV, while cream formulations containing Acyclovir are most commonly used in topical treatment. Especially due to the low bioavailability, low permeability and short half-life (3 hours) of Acyclovir, topical application is long-term and frequently repeated. Advanced treatments are needed to expand these problems seen in treatment and to process patient compliance. In this study, the topical adhesive film formulations prepared will increase the interaction of Acyclovir with the mucosa and prolong the drug release, thus reducing the dose and increasing patient compliance. The bioadhesive polymers used, chitosan and polyacrylic acid, will increase the penetration properties of acyclovir and its passage through the skin, thus ensuring that the drug reaches the depths of the mucosa. As a result of the in vitro characterization studies, it was concluded that Acyclovir-loaded chitosan/polyacrylic acid film formulations are promising systems for the topical treatment of Herpes Simplex.

Key Words: Acyclovir, topical, film, chitosan, polyacrylic acid.

Supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Fast Support Project with number 20856.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	15
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Derinin Genel Özellikleri	4
2.1.1 Epidermis	5
2.1.2 Dermis	5
2.1.3. Hipodermis	6
2.1.4. Deriden Emilim	6
2.1.5. Deriden Emilimi Etkileyen Faktörler	7
2.1.6. Dudak ve Dudak Yapısı	10
2.1.7. Herpes Simpleks Hastalıkları	11
2.1.8. Topikal İlaç Uygulaması	14
2.1.9. Film Oluşturma Yöntemleri	20
2.2. Asiklovir	23
2.2.1. Asiklovirin Fizikokimyasal Yapısı	23
2.2.2. Asiklovirin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri	24
2.2.3. Asiklovirin HSV Tedavisinde Kullanımı	24
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	27

3.2. Yöntem ve Deneyleler	28
3.2.1. Asiklovirin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	28
3.2.2. Kalibrasyon	28
3.2.3. Analitik Yöntem Validasyonu	28
3.2.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	30
3.2.5. Hazırlanan Mukoadezif Film Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu	33
4. BULGULAR	37
4.1. Asiklovirin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	37
4.2. Kalibrasyon	37
4.3. Analitik Yöntem Validasyonu	38
4.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	44
4.5. Hazırlanan Mukoadezif Film Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu	44
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇ	70
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER	73
EK-1: Turnitin Ekran Görüntüsü	
EK-2: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA:	Asetik asit
a/a:	Ağırlık/ağırlık
ACY:	Asiklovir
AuC:	Eğri altında kalan alan
CS:	Kitosan
FTIR:	Fourier transform infrared spektroskopisi
HPLC:	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HSV:	Herpes Simpleks virüsü
HSV-1:	Tip-1 Herpes Simpleks virüsünün hastalığı
HSV-2:	Tip-2 Herpes Simpleks virüsünün hastalığı
LOD:	Tanıma Sınırı
LOQ:	Alt tayin sınırı
PAA:	Poliakrilik asit
PBS:	Fosfat tampon
SEM:	Taramalı elektron mikroskobu
SS:	Standart sapma
St:	Stratum
TPA:	Texture Profile Analysis
VK:	Varyasyon katsayısı
X:	Ortalama

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Derinin yapısı ve katmanları	6
2.2. Deriden geçiş yolları	7
2.3. Dudak yapısı	10
2.4. Oral mukozanın yapısı	11
2.5. Transdermal yamalar, film sistemler ve yarı katı ilaç formülasyonlarının salım profili	16
2.6. Kitosanın yapısı	17
2.7. Poliakrilik Asit'in yapısı	18
2.8. Çözücü buharlaştırma metodu	22
2.9. Asiklovir'in kimyasal formülü	22
2.10. Asiklovir'in etki mekanizması	24
4.1. Asiklovir'e (100 ppm) ait HPLC kromatogramı	36
4.2. Asiklovir'in kalibrasyon doğrusu ve denklemi	37
4.3. Asiklovir, Kitosan ve Poliakrilik Asit'in HPLC spektrumlarının karşılaştırılması	41
4.4. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı adezyon kuvveti üzerine etkisi	46
4.5. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin birlikte adezyon kuvveti üzerine etkisi	46
4.6. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı mekanik özellik (gerilme direnci) üzerine etkisi	47
4.7. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin birlikte mekanik özellik (gerilme direnci) üzerine etkisi	47
4.8. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı şişme üzerine etkisi	48
4.9. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin birlikte şişme üzerine etkisi	48
4.10. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı parçalanma üzerine etkisi	49
4.11. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin birlikte parçalanma üzerine etkisi	49
4.12. Boş ve ACY yüklü CS/PAA film formülasyon görüntüleri	51
4.13. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonunun zamana karşı % şişme grafiği	53
4.14. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonunun zamana karşı % parçalanma grafiği	54
4.15. A) Boş CS/PAA film formülasyonu b) ACY yüklü CS/PAA film formülasyonu c) ACY d) PAA e) CS'a ait FTIR spektrumları	58

4.16. ACY, CS, PAA, Boş CS/PAA film formülasyonu, ACY yüklü CS/PAA film formülasyonuna ait DSC termogramları	59
4.17. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonuna ait SEM görüntüleri.	60
4.18. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonu ve serbest ACY çözeltisinden in vitro ACY salım profili	61

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Herpes simpleks virüsüne (HSV) karşı etkili antiviral ajanlar	13
3.1. Boş CS/PAA film formülasyonlarında kullanılan PAA ve CS'a ait konsantrasyon değerleri.	31
3.2. Asiklovir yüklü CS/PAA film formülasyonlarında kullanılan PAA ve CS konsantrasyonları	32
3.3. Faktoriyel Tasarım	32
4.1. Asiklovir'in HPLC ile miktar tayininde elde edilen lineer regresyon verileri	38
4.2. Asiklovir'in geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayısı değerleri	39
4.3. Asiklovir'in tekrar edilebilirlik sonuçları	40
4.4. Asiklovir'in tekrar elde edilebilirlik sonuçları	41
4.5. Asiklovir'in günler arası farklılık sonuçları	41
4.6. Asiklovir'in 24 saatlik stabilite ölçümleri	44
4.7. Boş CS/PAA film formülasyonlarında kullanılan PAA ve CS'a ait konsantrasyon değerleri	44
4.8. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları hazırlanmasında kullanılan CS ve PAA konsantrasyon değerleri	45
4.9. Faktöriyel tasarım için kullanılan bağımsız değişkenler ve tasarım için kullanılan analiz verileri	46
4.10. Yanıtlar (şişme, parçalanma, adezyon kuvveti ve mekanik özellik) için ANOVA sonuçları	46
4.11. Optimum CS ve PAA konsantrasyonu için ANOVA sonuçları	53
4.12. Film ağırlık ve kalınlık tekdüzelik tayini verileri	54
4.13. Film katlanma dayanıklılığı tayini verileri	55
4.14. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonuna ait mekanik özellik verileri	58

1. GİRİŞ

Herpes simpleks virüsü (HSV) günümüzde oldukça yaygın bir hastalıktır. Tip 1 (HSV-1) ve tip 2 (HSV-2) olmak üzere iki türevi vardır. HSV-1 genel olarak, ağız ve dudaklarda tutulmakta iken HSV-2 genital bölge enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Nüfusun %88'inden fazlasının 40 yaşına kadar HSV tip 1 (HSV-1) ile enfekte olduğu bilinmektedir. HSV-1, öncelikle kontamine tükürük veya diğer sekresyonlarla doğrudan temas yoluyla yayılır. Hastalığın başlangıcı genellikle ani olup, karakteristik lezyonlar ile kendini gösterir (1).

HSV enfeksiyonunun topikal, oral veya parenteral yol ile tedavi edilebilmektedir. En yaygın tedavi şekli sentetik bir asiklik pürin-nükleozid analogu olan Asiklovir'in topikal yolla uygulamasıdır (2, 3).

Virüsün topikal tedavisinde Asiklovir içeren krem formülasyonları yaygın olarak kullanılmaktadır. (%5 a/a) Asiklovir içeren krem formülasyonları, lezyonlar üzerine veya enfeksiyon başlamasından sonra belirmesi beklenen lezyonlara uygulanır. Günde 5 kez, gece dozu atlanarak yaklaşık 4 saatlik aralıklarla uygulanmaktadır. En az 5 gün boyunca tedavi uygulanması gerekmektedir. İyileşmemesi durumunda ise tedavi 10 güne kadar uzamaktadır (4).

Topikal yolla ilaç uygulanmasının oral ve parenteral uygulamalara göre birçok avantajı vardır. Topikal yolla ilaç uygulaması oral ilaç uygulamasında karşılaşılan gastrointestinal kanaldaki ilaç emilim problemleri, karaciğer ilk geçiş etkisi, ilaç yutma güçlükleri, mide bulantısı ve kusma gibi birçok problemin önlenmesine olanak tanırken parenteral ilaç uygulamasına göre de daha kolay ilaç uygulaması sağlayarak hasta uyuncu yüksek bir tedavi şekli olmaktadır. Ayrıca topikal uygulama ile uzun süreli ve kontrollü ilaç salımı da sağlanabilmektedir (5).

Bukkal ilaç uygulaması, ağız boşluğu içerisinde yanağın iç kısmında yer alan bukkal mukozaya ilaç uygulamasıdır. Bukkal ilaç uygulaması ile hem lokal hem de sistemik ilaç etkisi sağlanabilmektedir. Bu yol, belirtmiş olduğumuz topikal yolla uygulama ile sağlanan tüm avantajlara da sahiptir. Bukkal yol ile genellikle tablet uygulaması yapılırken, kişiselleştirilebilir boyutu, esneklik ve uygulama kolaylığı

nedeniyle mukoadezif bukkal filmler de bu yol için iyi bir alternatif sunmaktadır. Mukadezif bukkal filmler bu avantajları yanı sıra uzun süreli ilaç salımında da oldukça kullanışlıdır (6).

Kitosan, biyoyumluluk, düşük toksisite ve biyobozunur özellikleri sayesinde birçok ilaç formülasyonu için tercih edilmektedir. Kitosan'ın bu avantajlarına ek olarak film oluşturuıcı özelliği sayesinde, sürekli ilaç salımı için de tercih edilmektedir. Kitosan, mukoadezif ve katyonik özellikleri nedeniyle anyonik polimerler ile etkileşimleri de incelenerek mukoadezif film formülasyonları için kullanılabileceği öngörülmüştür. Ayrıca kitosanın penetrasyon özellikleri de incelenmiş ve bu penetrasyon özelliği sayesinde mukoadezif filmler için tercih nedeni olmuştur (7).

Anyonik bir polimer olan Poliakrilik asit de kitosan gibi membran penetrasyonunu arttırıcı özelliği bilinmektedir. Membran penetrasyonunu arttırıcı özelliğini hücre dışı Ca^{2+} 'yı şelatlama yeteneğinden sağladığı bulunmuştur. Bu özellikleri sayesinde birçok film formülasyonunda kullanılmak üzere araştırılmıştır (8).

Asiklovir, HSV başta olmak üzere birçok viral enfeksiyonun tedavisinde kullanılmaktadır. Ağız ve genital bölge HSV lezyonları, zona ve suçiçeği gibi viral enfeksiyonlarda Asiklovir ilk tercih edilen terapötik ajandır. Asiklovir yalnızca mevcut olan semptomların tedavisinin yanı sıra enfeksiyonun nüksetmesini engellemek ve korunmak amacıyla da kullanılmaktadır. Ancak bu, enfeksiyonların tedavisi değildir. Ayrıca bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde asiklovir, virüsün vücudun diğer bölgelerine yayılarak ciddi enfeksiyonlara neden olma riskini de azaltabilir (4).

Asiklovir düşük biyoyararlanıma sahip olup krem formülasyonu, ortam koşullarına karşı koruyucu bir etki sağlamaması nedeniyle uygulama sıklığı çok fazladır. Uygulama sıklığı ve tedavi süresinin uzun olması hasta tarafından düzenli bir şekilde uygulanmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada hasta uyuncu ve tedavi etkinliğini arttırmak hedeflenmiştir. Öncelikle ilacın uygulama bölgesinde uzun süre kalması ve stabilitesini arttırmak amacıyla film formülasyonu hazırlanmıştır. Film formülasyonu; ilacın, uygulama bölgesinde tutulumunu sağlayacak ve ilacı ortam

koşullarından koruyacak film tabakası sayesinde etken maddenin uzun süre uygulama bölgesinde kalmasını sağlayacaktır. Bu sayede ilacın uygulama sıklığı azaltılacak ve hasta uyuncu arttırılmış olacaktır. Ayrıca ilacın topikal biyoyararlanımı ve tedavi etkinliğini arttırmak amacıyla mukoadezif özellikte kitosan ve poliakrilik Asit polimerlerinin kullanılması ile Asiklovir'in penetrasyonunun iyileştirilmesi dolayısıyla Asiklovir'in tedavi etkinliğinin arttırılmasının sağlanabileceği öngörülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Genel Özellikleri

Deri vücudun çoğunluğunu kaplayan, oldukça karmaşık olan ve insan vücudundaki en büyük organdır. Yetişkin bir insanda yüzey alanı 1.5 ile 2.0 m² arasında değişmekte olan deri vücudu susuzluktan, dış yaralanmalardan ve bakteriyel veya viral enfeksiyonlardan korumak için ilk savunma hattıdır. Ayrıca kişiden kişiye değişmekle birlikte 0.6mm ile 2.4 mm arasında bir kalınlığa sahiptir. Deri, epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç katmandan oluşur (9).

Deri, kendi katmanlarında kan damarları, lenfatik damarlar, sinir sistemi, yağ ve ter bezleri gibi çeşitli yapıları içerir ve vücudumuzun olmazsa olmaz bir parçası olarak, hayati faaliyetlerimizin sağlanmasında birçok önemli işlevleri yürütür (10).

Deri epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere 3 temel katmandan oluşur. Epidermis esas olarak keratinositlerden meydana gelmekle birlikte melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücrelerini de yapısında bulundurur. Dermiste ise papiller ve retiküler tabaka bulunmaktadır. Dermis kan damarlarının bulunduğu katmandır. Hipodermis ise derinin en alt tabakasında yer alırken yağ dokusu ile gevşek bağ dokusundan meydana gelmektedir (11).

2.1.1 Epidermis

Epidermis derinin en dışında yer alır. Derinin rengi, dokusu ve neminden sorumludur. Epidermis, skuamöz ve keratinize hücrelerden oluşur ve 4 katmanlı bir yapıya sahiptir (11).

Epidermis, cinsiyet, genetik, coğrafya gibi birçok etkene bağlı olmakla birlikte ortalama olarak 0.05 ile 0.3 mm arasında bir kalınlığa sahiptir. Epidermisin kalınlığı, ilaç geçirgenliği için önemli bir faktördür (12).

Epidermis, temel olarak skuamöz ve keratinosit hücrelerinden oluşur ve dıştan içe doğru stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum ve stratum basale olmak üzere 5 tabakadan oluşmaktadır (11).

2.1.2 Dermis

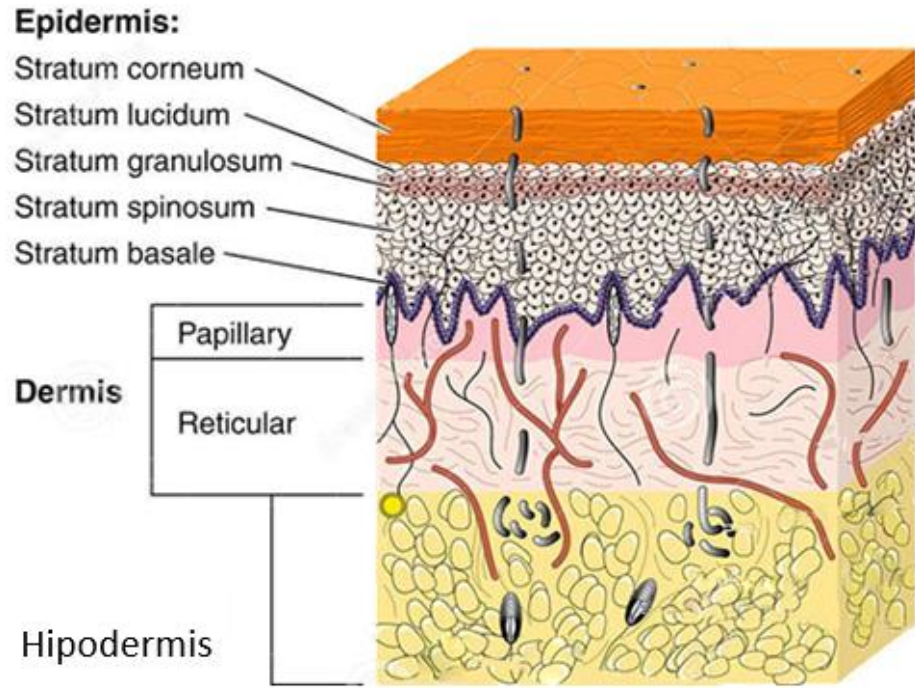
Dermis, epidermis ve hipodermis katmanları arasında yer almakta olup ortalama 2 ile 4 mm arasında bir kalınlığına sahiptir. Derinin en kalın katmanı olması nedeniyle derinin fiziksel etmenlerden korunmasında rol almaktadır. Dermis, kendi içerisinde papiller tabaka ve retiküler tabaka olarak iki katmandan oluşmaktadır (13).

Papiller tabaka, dermisin en üstünde bulunur. Papiller tabaka, içerdiği elastik ve ince kolajen lifleri sayesinde esnek ve ince bir yapıya sahiptir. Ayrıca bolca kan damarı, sinir lifi içermektedir. Papiller tabakası, hücrelerin deriye adezyonunun arttırılmasını sağlayarak dermisten hücre geçişinde önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra makrofaj ve mast hücresi gibi birçok hücreyi de yapısında bulundurmaktadır (13).

Retiküler tabaka, dermisin yaklaşık %70'ini oluşturan kalın bir tabakadır. Dermisten madde geçişinin gerçekleştiği, düzensiz dizilimli kollajen liflerinden oluşur ve yapısında elastin lifleri ve hyaluronik asit içermektedir. Retiküler tabaka, papiller tabakaya göre daha kalın ve yoğun bir lif ağına sahip iken yapısında daha az sinir lifleri, damar, melanosit ve mast hücresi bulundurmaktadır (14).

2.1.3. Hipodermis

Hipodermis tabakası, dermis ile kas dokusu arasında bulunmakta olup yağ ile bağ dokusundan oluşmaktadır. Hipodermis enerjinin depolanması ve vücudun fiziksel darbelerden korunmasında görev almaktadır (15).

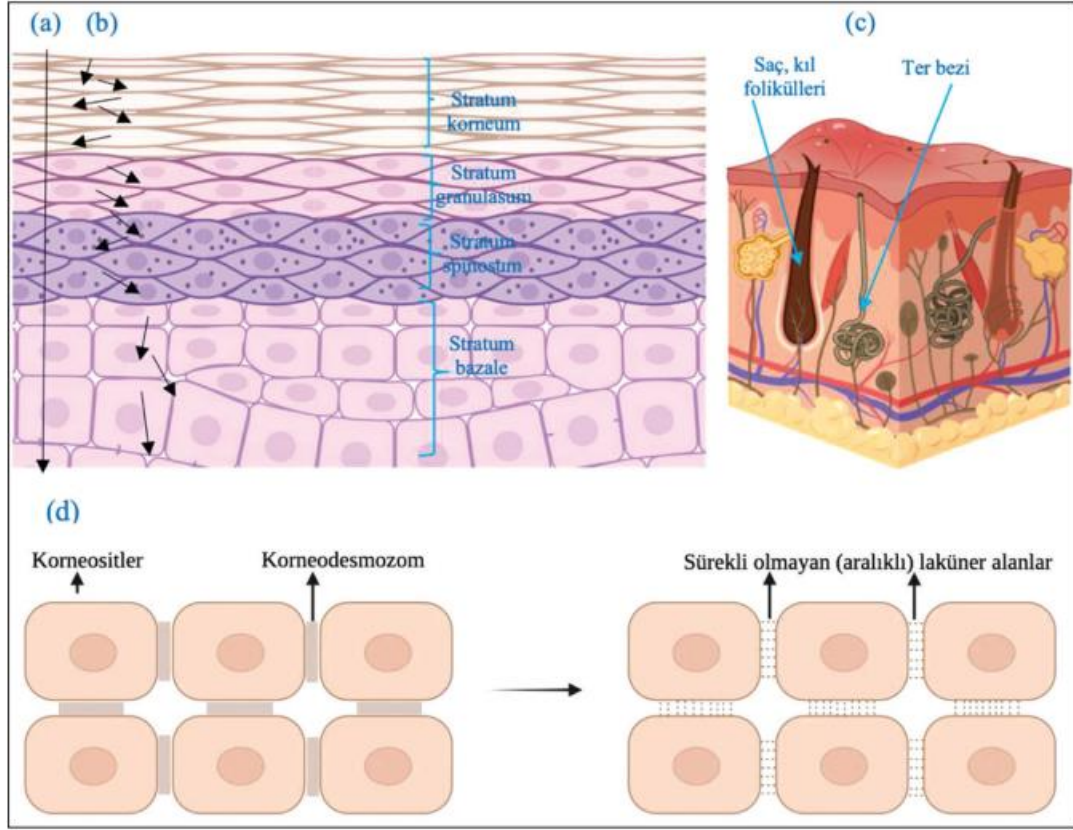


Şekil 2. 1. Derinin yapısı ve katmanları

2.1.4. Deriden Emilim

Deriye uygulanan ilacın emilmesi, ilaç formülasyonunun etken maddeyi salması, etken maddenin deriden penetrasyonu ve kılcal damarlara ulaşım sistemik dolaşıma katılımı ile gerçekleşmektedir (16).

Emilim için öncelikle etken madde deriye uygulanır. Uygulanan etken maddenin stratum korneumunda partasyonu birinci aşamadır. İkinci aşama olarak pasif difüzyonla epidermisten geçen ilaç, üçüncü aşamada ise dermise penetre olur. Sonuç olarak, ilacın deri altına geçişi ve damarlara ulaşımı sonucunda etken madde dolaşıma katılmış olur (16).



Şekil 2.2. Deriden geçiş yolları: a yolu hücreler içi yol, b yolu hücreler arası yol, c yolu transpendageal yol (kıl folikülleri, yağ ve ter bezleri), d gözenek yolu.

Porlardan ya da Boşluklardan Geçiş

Porlardan ya da boşluklardan geçiş genellikle kıl folikülü ve ter bezleri aracılığıyla gerçekleşir. Etken madde bu geçiş yolağında oldukça az bir direnç ile karşılaşır. Bu yoldan geçişin sağlanabilmesi için etken maddenin yüksek derecede suda çözünebilen bir yapıya sahip olması gerekmektedir (17).

Bu yolak ile geçişi sağlayan kıl folikülleri deri yüzeyinin yaklaşık % 0.1-0.2'sini kapsamaktadır. Bu nedenle yapılan deneylerde kıl folikülü sayısı ile etken maddenin deriden geçişi arasında doğrusal bir etkileşim saptanamamaktadır. Ancak yine de deri emilimi için göz ardı edilemeyecek bir geçiş yolu olduğu kabul edilmektedir. Çeşitli yöntemler ile bu yolağın daha geçirgen hale getirilmesi ilaç emilimi için önemli olduğu düşünülmektedir (17).

Transselüler Yol

Transselüler yolda etken madde deri hücrelerinin içinden geçerek ilerler. İçinden geçiler bu hücreler genellikle korneositlerden meydana gelmektedir. Hücrelerin yapısında buluna keratin ve keratohiyalin nedeniyle hücrelerden madde geçişi oldukça zordur. Porlardan geçişe nazaran bu yoldan genellikle polar olmayan maddeler geçebilmektedir (18).

İnterselüler Yol

İnterselüler yolda etken madde korneositlerin arasındaki lipit yapısından geçerek ilerler. Lipit yapı içerisinden geçebilmesi için etken maddenin yüksek yağ/su partiyon kabiliyetine sahip olması gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle etken maddenin bu yoldan geçme kabiliyeti partiyon kabiliyetine oranlanabilmektedir (19).

2.1.5. Deriden Emilimi Etkileyen Faktörler

Deriden emilimi etkileyen 4 ana faktör bulunmaktadır:

- Biyolojik faktörler
- Derinin fizyolojik durumu
- Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri
- Formülasyon ve kullanılan yardımcı maddelerin etkisi.

Biyolojik Faktörler

Etken maddenin emilimi kişinin yaşına, uygulanan vücut bölgesine ve hidrasyonuna göre etkilenmektedir. Vücudun farklı bölgelerinde derinin yapısındaki lipit içeriği farklı olması nedeniyle etken maddenin geçişi bölgeye göre değişiklik göstermektedir (20).

Derinin Fizyolojik Durumu

İnsan vücudundaki toplam suyun (%20) neredeyse tamamı (%18) deride bulunmaktadır. Derideki bu su içeriğini proteinler ve mukopolisakkaritler

sağlamaktadır. Deri yapısında bulundurduğu bağ dokusu sayesinde bu kadar yüksek oranda suyu yapısında bulundurabilmektedir. Yapıda bulunan yüksek orandaki bu su nedeniyle ilaç etken maddesinin deriden emilimi de etkilenmektedir (20).

Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri

Etkin maddelerin deriden geçişinde, molekülün hidrojen bağı yapma yeteneği, çözünürlük özellikleri ve oktanol/su partiyon katsayısı gibi fizikokimyasal özellikler büyük önem taşır. Molekülün partiyon kabiliyeti, üzerindeki fonksiyonel gruplar ve yapısal özelliklerle ilişkilidir. Molekülün hidrojen bağı yapma yeteneği ve pozitif yük yoğunluğu arttıkça, molekülün yağda çözünürlük oranı da artar. Yağda iyi çözünür maddeler, lipit yapısındaki membranlardan daha kolay geçiş sağlar. Bir maddenin iyonize olup olmaması, pH'a bağlıdır ve pH, maddenin pKa değerine yaklaştığında daha fazla noniyonize formda bulunur. Noniyonize formda olan maddeler, lipit tabakalarına ve membranlara daha iyi dağılır ve dolayısıyla deriden geçişleri daha verimli olur. Son dönemde, ilaç moleküllerinin üzerindeki yerel elektrik yüklerinin, deriden geçişleri üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (21).

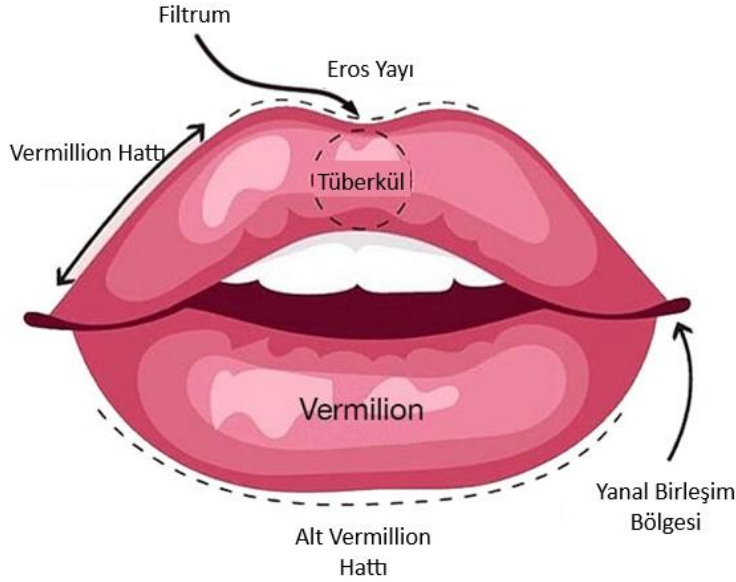
Formülasyon ve Yardımcı Maddelerin Etkisi

İlaç etken maddesinin deriden emiliminde hazırlan formülasyonun özellikleri oldukça önemlidir. Deriden emilimin sağlanabilmesi için formülasyonun etken maddeyi salabiliyor olması gerekmektedir. Daha sonra, difüzyon teorisine göre etkin madde membranı geçmek zorundadır. Formülasyonda yer alan bazı maddeler, penetrasyon artırıcı olarak işlev görebilir ve etkin maddenin deri üzerindeki dağılımını etkileyebilir. Ayrıca, formülasyonun pH'ı, etkin maddenin pKa değeri ve molekülün iyonizasyon durumu, deriden geçişi etkileyen önemli faktörlerdir (22).

2.1.6. Dudak ve Dudak Yapısı

Yapısında nonkeratinize ve pigmentli epitel dokuya sahiptir. Dudak yapısında Stratum korneum tabakası bulunmaz bu nedenle deri altındaki kan damarları dudağın kırmızı renkte görünmesini sağlar (23).

Dudak; kas dokusu, deri ve mukozal yapıdan meydana gelmektedir. Ayrıca yapısında labial arter, ven ve sinirler, fibroadipoz bağ dokusu ve tükürük bezleri bulundurmaktadır (23).



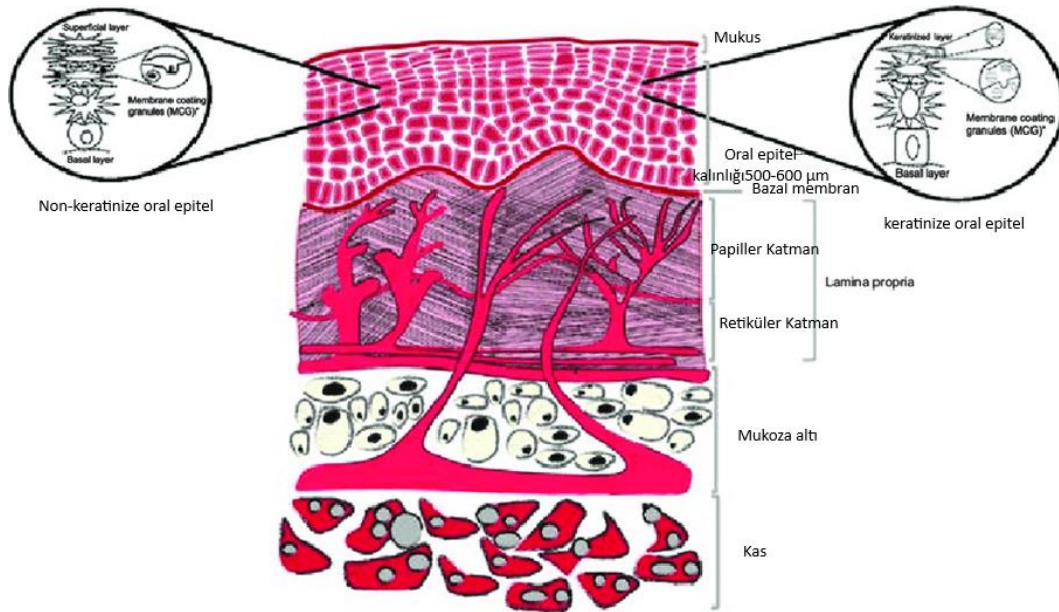
Şekil 2.3. Dudak Yapısı

Mukoza ve Yapısı

Ağız boşluğu sınırları içindeki yapıları kaplayan mukoza zarı, oral mukoza olarak bilinir. Bu, dudakların vermilion sınırı ile labial mukoza arasındaki bağlantı noktasından ön tarafta palatofaringeal kıvrımlara kadar uzanan ıslak yumuşak doku zarıdır (6, 24).

Histolojik olarak, oral mukoza üç katmandan oluşur, kalınlığı ve keratinizasyon derecesi konuma ve işlevsel gereksinimlere bağlı olan oral epitel olarak bilinen yüzeysel skuamöz tabakalı epitel; altında lamina propria olarak bilinen bağ dokusu ve en altta bulunan yoğun düzensiz bir bağ dokusu olan submukoza bulunur. Submukoza, lamina proprianın doğrudan kemiğe veya kasa bağlı olduğu bazı oral boşluk bölgelerinde yoktur (6, 24).

Oral mukozanın geliştirdiği çeşitli işlevler arasında esas olarak alttaki dokularını mekanik, kimyasal ve biyolojik uyanlardan korumak, temel maddelerin salgılanması ve sıcaklık, dokunma, ağrı ve tat algısını sağlayan duyuasal bir işlev yer alır. (6, 24).



şekil 2.4. Oral mukozanın yapısı

Mukozal Absorbsiyon

Mukozal absorpsiyon, etkin maddenin sistemik etki yaratması istenmediği durumlarda tercih edilir. Bu yöntem ile sistemik etkiye neden olmadan lokal enfeksiyonların tedavisi sağlanabilir (25).

Epitel Doku

Vücutun dışını kaplayan, ektoderm, mezoderm ve endoderm olarak 3 tabakadan oluşmaktadır. Mide, ince bağırsak ve kalın bağırsakta, tek tabakalı hücrelerden oluşan epitel doku bulunurken, deri, ağız mukozası ve yemek borusu ise çok katmanlı epitel doku ile kaplanmıştır. Epitel doku, maddelerin deriden geçişinde kritik rol oynayan yapıdır (26).

Mukus ve Yapısı

Mukoadezif formülasyonlar mukus adı verilen jel kıvamlı viskoz bir sıvı yüzeyine uygulanır. Mukus vücudun farklı bölgelerinde farklı içerikte bulunabilirler, ancak genel anlamda glikoproteinler, mineral tuzları, serbest protein, enzim elektrolitleri ve yüksek oranda sudan meydana gelmektedir (25).

2.1.7. Herpes Simpleks Hastalıkları

80'den fazla herpes virüsü tanımlanmış olup, bunların 8'i bilinen insan patojenleridir (27, 28). Herpes simpleks virüsleri Herpesviridae virüs ailesine aittir. HSV ile ilişkili hastalıklar, yetişkin insanların %60-95'ini etkileyen en yaygın enfeksiyonlar arasındadır. Enfeksiyonun kesin bir tedavisi yoktur, konak hayatı boyunca enfeksiyonu taşımaktadır. Bağışıklığın zayıflaması ile belirtiler tekrar görülebilmektedir (2, 29).

Herpes Simpleks Virüs enfeksiyonuna dünyanın her bir bölgesinde karşılaşıldığı bildirilmiştir. Yılın farklı dönemlerinde enfeksiyonunun farklılık göstermediği, iklim koşullarından da etkilenmediği raporlanmıştır. Virüsün insan haricinde bir konağına da saptanmamıştır (30).

HSV enfeksiyonu nedeniyle ölüm raporlanması çok nadirdir. Ölümcül bir enfeksiyon olmamasına rağmen birçok çalışma HSV ile rahim ağzı kanserini eşleştirmektedir (31).

Herpes simpleks virüsü tip 1 (HSV-1), özellikle ağız bölgesinde enfeksiyona neden olan ve ağız yoluyla bulaşan bir virüstür. Herpes simpleks virüsü tip 2 (HSV-2) ise tip 1'in aksine genellikle cinsel yolla bulaşır ve enfeksiyon genital bölgede yayılım göstermektedir. Ancak HSV-1'in oral seks yoluyla bulaşarak genital enfeksiyona neden olma potansiyeli de vardır. Tip 1 HSV enfeksiyonları tip 2 HSV enfeksiyonlarına göre daha az ciddi seyretmekte olup nüksetme olasılığı daha düşük olduğu bilinmektedir (31).

HSV enfeksiyonu çocukluk ve ergenlik döneminde yaklaşık %75 civarında görülürken, gelişmiş ülkelerde çocukluk ve ergenlik dönemindeki kişilerde daha az

görülmekte olup genellikle orta ve üst sınıf bireylerde yaygın olarak görülmektedir (32).

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki vakalar incelendiğinde tip 1 HSV enfeksiyonu üzerinde ırkların da bir faktör olduğu görülmüştür. Afrika kökenleri Amerikalılarda oran %30'dan fazla iken beyaz Amerikalılarda bu oran %20 civarındadır. HSV-1 enfeksiyonu üniversite öğrencilerinde %10'un altında seyretmektedir (32).

Tip 2 HSV enfeksiyonu orta yaşlı bireylerde %60 üzerindeki genç yaşta enfeksiyon oranı bunun yarısı kadardır. Bunun yanı sıra tip 2 HSV enfeksiyonunu etkileyen birçok faktör de bulunmaktadır. 1960'lı yılların sonundan bu yana hızlıca artış gösteren tip 2 HSV enfeksiyonu cinsiyete bağlı olarak kadınlarda daha çok görüldüğü, Afrika kökenli bireylerde beyazlara oranlara daha fazla görüldüğü ve çok eşli bireylerde enfeksiyonun artış gösterdiği raporlanmıştır (32).

Herpes simpleks enfeksiyonlarının teşhisinde 2 farklı yöntem kullanılabilir. Bunlardan biri hücre kültüründe virüs izolasyonu veya PCR testleri. PCR testleri hücre kültürü yöntemine göre daha pahalıdır (33).

Tedavi Yöntemleri

HSV enfeksiyonuna karşı antiviral aktivite için başlangıçta, antikanser tedavisi için geliştirilen İdoksüridin gibi nükleozit analogları kullanılmıştır. Bu nükleozit analogları sistematik olarak verildiğinde toksisiteye neden olduğu kanıtlanmış ve tedavi yöntemi olarak kullanılmaktan vazgeçmiştir. İdoksüridin'in bu yüksek sistemik toksisitesi nedeniyle topikal kullanımından da kaçınılmıştır (3).

1960'lı yıllarda trifluridin geliştirilmiştir. Ancak trifluridin'in GIS ve karaciğer enzimleri ile metabolize oluyor olması nedeniyle biyoyararlanımı oldukça düşüktü. Ancak 1972 yılındaki bir çalışmada trifluridin'in topikal uygulaması HSV tedavisi için bir ajan olabileceğini göstermiştir (3).

1960'lı yıllarda sentezlenen başka bir antikanser ilacı olan vidarabinin de HSV enfeksiyonları için etkin bir tedavi olanağı sunduğu görülmüştür. Ayrıca bu bileşiğin 1972'de HSV'nin topikal tedavisi için kullanılmaya başlandığı da raporlanmıştır (34).

Asiklovir ise yine 1960'lı yıllarda Burroughs Wellcome Fund tarafından başlatılan bir çalışma ile keşfedilmiştir. Asiklovir, klinik çalışmaların tamamlanması ile ilk defa 1982 yılında hem HSV-1 hem de HSV-2'nin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu süreçte HSV'nin tedavisi için kullanılmış olan ve hala kullanılmaya devam eden antiviral ajanları Tablo 2.1.'de gösterilmektedir (4).

Tablo 2.1. Herpes simpleks virüsüne (HSV) karşı etkili antiviral ajanlar (35).

Antiviral İlaç	Amerika'da Kullanım Durumu	Dezavantaj	Formülasyon	Yenidoğan Çalışma Yapıldı mı?
Idoxudirine	Üretilmiyor	Toksisite	Topikal	Hayır
Trifluridine solution	Kullanılıyor	Sistemik inaktivasyon	Topikal	Evet
Vidarabine	Üretilmiyor	Toksisite	İntravenöz, topikal	Evet
Brivudine	Kullanılmıyor	Yenidoğan verisi yok	Oral	Hayır
Asiklovir	Kullanılıyor	Geri dönüşümlü nefrotoksisite, nötropeni, düşük oral biyoyararlanım	İntravenöz, topikal, oral	Evet
Valasiklovir	Kullanılıyor	Yenidoğan verisi yok	Oral	Hayır
Famsiklovir	Kullanılıyor	Yenidoğan verisi yok	Oral	Hayır
Gansiklovir	Kullanılıyor	Ciddi nötropeni ve teratojenik	İntravenöz, topikal	Evet
Valgansiklovir	Kullanılıyor	Neonatal HSV enfeksiyonunda test edilmemiştir, oral yol akut neonatal HSV hastalığı için daha az güvenilirdir	Oral	Evet
Foscarnet	Kullanılıyor	Elektrolit bozukluğu ve nefrotoksisite	İntravenöz	Hayır
Cidofovir	Kullanılıyor	Geri dönüşümlü nefrotoksisite	İntravenöz	Hayır

2.1.8. Topikal İlaç Uygulaması

Topikal ilaç uygulaması genel cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Tedavi edilmesi hedeflenen lezyonlar üzerine direkt uygulanır. İlaç formülasyonunun yapısına göre lokal veya sistemik etki sağlanabilir. Birkaç topikal ilaç formülasyonuna film, yamalar, merhem, çözelti, süspansiyon, losyon, krem, pudra, mikstür ve pat şeklindeki örnek verilebilir (36).

Deri enfeksiyonlarının tedavisinde lokal ilaç uygulamasının başlıca amacı lokal tedavinin sağlanması ve sistemik etkinin en aza indirgenmesidir. Bu sadece kullanılacak doz en aza indirilmiş olurken sistemik yan etkiler de olabildiğince ortadan kaldırılabilmektedir (37).

Topikal uygulamada ilacın etki gösterebilmesi için formülasyondan salınımın sağlanması, stratum korneum tabakasına geçmesi, daha sonra da canlı epidermise ulaşabilmesi gerekmektedir. Etken madde bu şekilde deride tutularak tedavi sağlanabilmektedir (38).

Film Formülasyonları

Film formülasyonlarında kullanılan polimerler, mukoadezif özelliklere sahip olup, etken maddenin kontrollü ve uzun süreli salımını sağlamaktadırlar. Bu sayede biyofarmasötik yetersizlikleri olan etken maddeler için bir film formülasyonu tasarlandığı ve ilaç etkinliğinin arttırıldığı gösterilmiştir. (39).

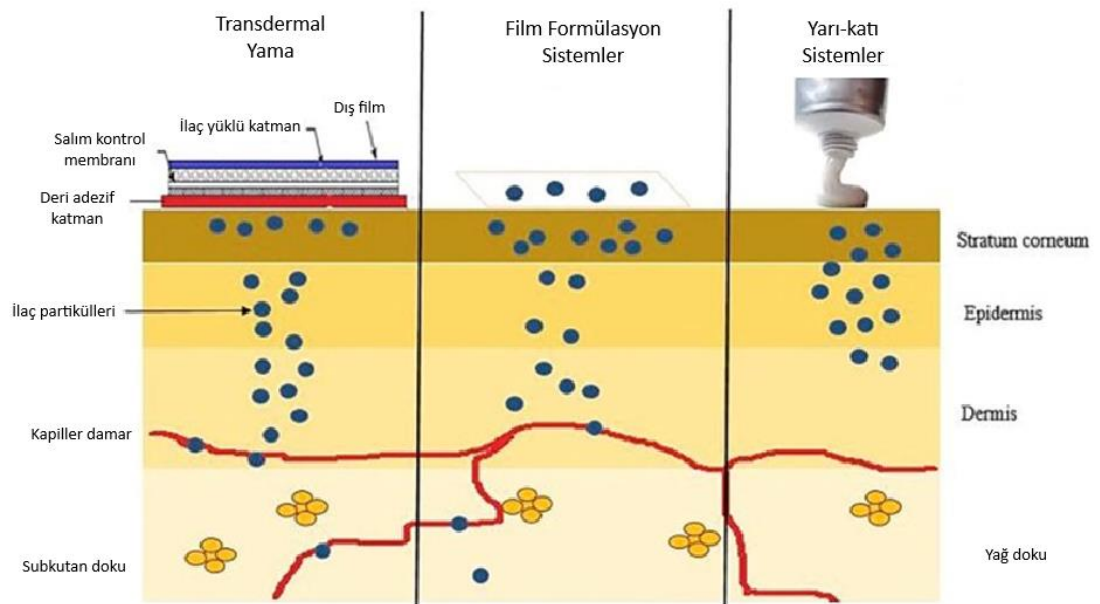
Mukoadezif filmlerin hızlı emilim, sistemik etkiye neden olmama, GIS sisteme katılmama gibi birçok avantajı vardır. Film formülasyonlarında diğer oral dozaj şekillerine göre yutma problemi yaşayan hastalar için hasta uyuncu sağlamaktadır (40).

Film formülasyonları genellikle hidrofillik yapıya sahipken, etken maddenin geçirgenliğini arttırabilmek amacıyla yapıya farklı özellikte yapılar da dahil edilebilmektedir (41).

Film formülasyonları hasta uyuncu ve uygun tedavi rejiminin sağlanabilmesi için gittikçe daha fazla tercih edilmektedir. İlaç etken maddelerin bölgeden tutunma

süresini ve biyoyararlanımını arttırmaları nedeniyle dozlama sıklığının da azaltılması sağlanmaktadır. Polimer özellikleri sayesinde deriden ilaç geçişini de arttırmaktadır. Bu sayede ilaç etkinliği de artırılmış olmaktadır. İstenmeyen etkilerin gözlenmesi halinde uygulama bölgesinden kolayca uzaklaştırılarak etkinin giderilmesi sağlanabilmektedir. Oldukça esnek bir yapıya sahip olmalarından kaynaklı biyoyoumludurlar. Ayrıca küçük ve hafif olmaları nedeniyle taşınımı da oldukça rahattır ve tedavi uyuncu yüksektir. (42).

Film formülasyonları, transdermal yamalar ve yarı-katı formülasyonların birçok özelliğini taşımaktadır. Etken maddenin depolanması ve rezervuardan yavaş salım ile sistemik etki ya da hedef dokuya kadar penetre olabilecek şekilde lokal etki için hazırlanabilirler (43).



Şekil 2.5. Transdermal yamalar, film sistemler ve yarı katı ilaç formülasyonlarının salım profili (43).

Oral Filmlerin Üstünlükleri

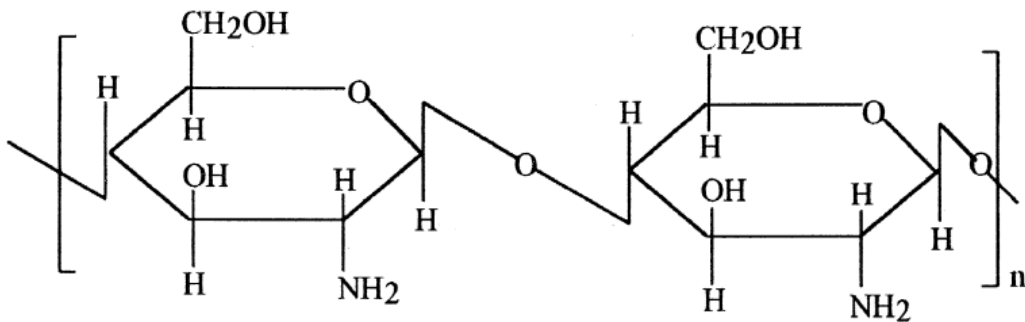
- Yanında bulundurmak oldukça kolaydır.
- Ayrı bir sistem ile dozlama yapılmasına gerek duyulmamaktadır.
- Mukzoda kalış süresini artırır ve uzun süreli ilaç salımı sağlar.

- Yutma sorunlarını ortadan kaldırır.
- Hızlı etki sağlanabilir.
- GIS emilime ihtiyaç duymazlar.
- Stabilitesi oldukça yüksektir.
- Biyoyararlanımı düşük etken maddelerin biyoyararlanımını arttıırırlar.
- Hazırlanması kolay ve ucuz formülasyonlardır (41).

Film Formülasyonlarının Bileşenleri

Film formülasyonlarının yapısında kullanılacak olan ilaç etken maddelerinin topikal ilaç uygulamasına uygun özelliklere sahip olmalıdır. Deriden geçirgenliği yüksek olmalı ve biyoyumlu olmalıdır. Kullanılacak olan polimerlerinde istenilen özelliklere sahip olması gerekmektedir. Polimerler istenen özelliklerin sağlanabilmesi için tek ve kombine halde formülasyona eklenebilirler. Polimerlerin de etken madde ile geçimli olması, biyoyumlu olması ve toksisiteye neden olmaması gerekmektedir. Formülasyonda kullanılan çözücüler polimerlerin ve etken maddeyi çözebilmeli ve geçimli olması gerekmektedir. (43).

Kitosan



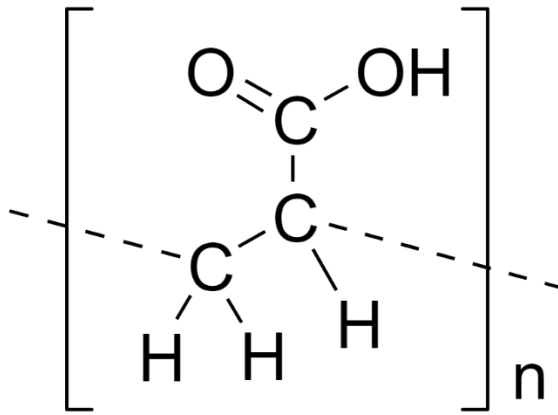
Şekil 2. 6. Kitosanın yapısı

Doğada bol miktarda bulunan bir mukopolisakkarit türevidir. Kabuklu deniz canlıları, böcekler ve benzeri canlıların kabuğunda destekleyici materyal olarak görev almaktadır. Kitin, kitinaz tarafından parçalanabilir. Nitrojen varlığına rağmen immünojenitesi son derece düşüktür. Selüloza benzeyen, suda çözünürlüğü oldukça düşük olan bir malzemedir ve C-2 pozisyonundaki hidroksilin bir asetamido grubu ile

değiştirildiği selüloz olarak kabul edilebilir. Selüloz gibi doğal olarak yapısal bir polisakkarit olarak işlev görür. (Şekil 2.9.) (44).

Kitin beyaz, sert, elastik olmayan, azotlu bir polisakkarittir. Kitosan, kitinin N-deasetillenmiş türevidir. Kitosanın, sentetik olarak elde edilmiş selüloza (%1.25) kıyasla nitrojen yüzdesi (%6.89) oldukça yüksektir. Bu, kitinin yararlı bir şelatlayıcı olmasını sağlar. Günümüz polimerlerinin çoğu sentetik malzemeler olduğundan biyoyumlulukları ve biyobozunurlukları kitosan ve türevleri gibi doğal polimerlere göre çok daha sınırlıdır. Ayrıca kitosan biyoyumluluk, biyobozunurluk, düşük toksisite, iyi adsorpsiyon özellikleri nedeniyle birçok ilaç formülasyonu için önerilmektedir (44).

Poliakrilik Asit



Şekil 2. 7. Poliakrilik asidin yapısı

Poliakrilik asit, akrilik asidin sentetik, yüksek molekül ağırlıklı bir polimeridir. PAA anyonik bir polimerdir, yani PAA yan zincirleri nötr pH'ta iyonize edilir ve negatif yük taşır. Bu nedenle PAA'lar suyu emip tutabilmekte ve orijinal hacimlerine kıyasla birçok kez şişebilmektedir. PAA, farmasötik, kozmetik ve boyalarda koyulaştırıcı, dağıtıcı, süspanse edici ve emülsifiye edici maddeler olarak kullanılır. Nötrleştirilmiş PAA jelleri, cilt bakımı veya tedavi jelleri gibi tıbbi uygulamalar için biyoyumlu matrisler oluşturmak için uygundur (8).

Sistemde karboksilik asidin varlığı, onu pH'a duyarlı bir dağıtım sisteminin tasarlanması için daha uygun hale getirir. Biyobozunurluk, toksik olmayan davranış,

biyoyuymulluk vb. gibi iyi bir farmasötik polimerin hemen hemen tüm niteliklerini taşır. Ancak mekanik dayanıklılığı da düşüktür. İdeal bir polimer için optimum mekanik dayanım çok önemli bir parametredir ve çapraz bağlanma veya moleküller arası siklizasyon yoluyla elde edilebilir. PAA'nın bu özelliği diğer polimerlerle kopolimerizasyonu ile elde edilebilir. PAA'nın çapraz bağlanması aynı zamanda çözelti formundaki polimerik sistemin kimyasal olarak ve ışınlamasıyla da sağlanabilir. Polimerizasyon sırasında monomer çözeltisi konsantrasyonunun, iyonik kuvvetin ve sistemin pH'sının, polimerin çapraz bağlanmasının kontrol edilmesinde çok önemli faktörler olduğunu bildirmiştir. PAA'nın emülsiyon sistemi için stabilizatör, nanopartikül formülasyonu geliştirme, kontakt lens geliştirme, oral ve transdermal matriks sistemi geliştirme gibi çok sayıda kullanımı vardır. PAA'nın iki farklı formu, yani karbomer ve farklı derecelerdeki karbopol; bukkal, vajinal, rektal vb. gibi diğer farklı yollardan ilaç dağıtımını için çeşitli sistemlerin geliştirilmesinde de kullanılmaktadır (8).

2.1.9. Film Oluşturma Yöntemleri

Yarı-Katı Döküm

Film bileşeni asitte çözünmeyen bir polimer olduğunda bu yaklaşım tercih edilir. Suda çözünebilen polimerler bu aşamada ilk olarak suda çözülür. Hazırlanan çözelti ayrı olarak hazırlanmış asitte çözünmeyen bir polimer çözeltisiyle karıştırılır. İki çözeltinin karıştırılmasının ardından, jel oluşturmak için son çözeltiliye yeterli miktarda plastizer eklenir. Son olarak ısı kontrollü tamburlar kullanılarak jel kütlesi filmlerin üzerine dökülür. Film kalınlığı 0,035 ila 0,125 cm arasında olmalıdır. Asitte çözünmeyen polimer, film oluşturucu polimerle 1:4 oranında kullanılmalıdır (45)

Sıcak Eriyik Ekstrüzyon

Granüller, uzatılmış salımlı tabletler, transdermal ve transmukozal ilaç dağıtım cihazlarının tümü bu yöntem ile hazırlanmaktadır. Geleneksel solvent döküm yaklaşımını kullanmak yerine, bu teknikte, bir polimeri bir film haline getirmek için ısı uygulanmaktadır. Etkin madde ve diğer bileşenler kuru halde karıştırılır, daha sonra ısıtılır ve son olarak erimiş halde kalıptan çıkarılır. Bu işlemlerde herhangi bir solvent

sistemi bulunmamaktadır. Hazırlanan eriyik haldeki film çözeltisi dökülür. Filmler uygun boyutlara kesilmeden önce soğutulur. Aşırı yüksek sıcaklıkların kullanılması nedeniyle bu teknik, ısıya dayanıksız etken maddeler için uygun değildir. Döküm ve kurutma işlemleri çok önemlidir. Ticari ölçekli üretim, döküm hızının ve kuruma süresinin optimizasyonunu gerektirir (46).

Katı Dispersiyon Ekstrüzyonu

Bu yöntem, ilacı yüklemek için ilacın katı bir dispersiyonunun erimiş bir polimer çözeltisine eklenmesini gerektirir. Katı bir dispersiyon oluşturmak için ilaç, uygun bir sıvı solvent içerisinde eritilir ve daha sonra sıvı solventi uzaklaştırmadan, 70°C'nin altında elde edilebilen uygun bir polimer eriyiğine eklenir. Son olarak boyalar, katı dispersiyonları filmlere dönüştürmek için kullanılır (47).

Sarma metodu

Su ve su ile alkol kombinasyonu bu yöntemde kullanılan en yaygın çözücülerdir. Aktif madde ve diğer bileşenler az miktarda sulu solvent içerisinde çözülür. Suda çözünebilen hidrokolloidler, homojen viskoz bir çözelti oluşturmak için suda çözülür. İlacı içeren çözelti veya süspansiyon daha sonra bir taşıyıcı üzerine sarılır. Daha sonra film uygun şekil ve boyutlarda kesilir (48).

Baskı metodu

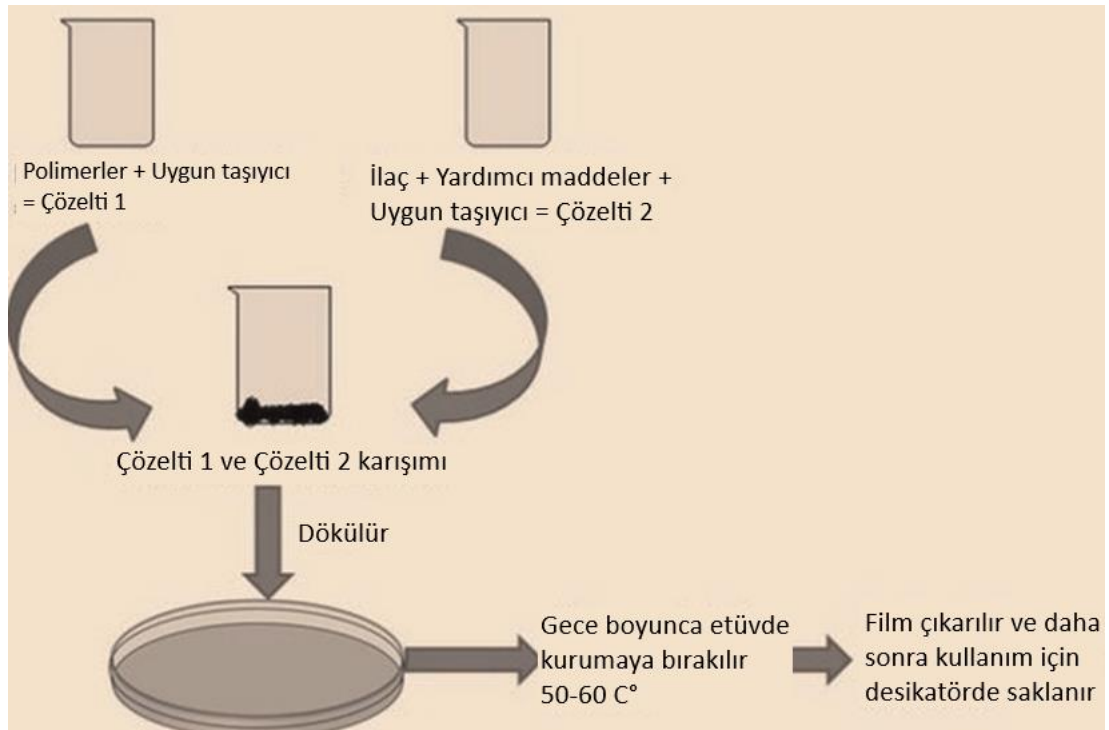
Polimerik ince filmler, 3D baskı gibi yeni teknolojiler kullanılarak üretilebilir. Belirli bir hasta için en yararlı olan doz formunun geliştirilmesi için bir platform olabilir. Çok yönlülüğü ve maliyet etkinliği nedeniyle baskı teknolojileri giderek daha popüler hale gelmektedir. İlaç sektöründe farmasötik dozaj formlarının tanımlanması veya etiketlenmesi, özellikle ürünün daha kolay tanımlanabilir hale getirilmesi ve sahte üretimin önlenmesi amacıyla baskı teknolojileri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntem son zamanlarda ilaçları tıbbi dozaj formlarına yüklemek için kullanılmaya başlandı. Hassas dozda tıbbi bileşenleri üretmek için ilaç yüklü mürekkeplere sahip kullanıma hazır mürekkep püskürtmeli yazıcıların kullanılması bir örnektir. Ayrıca inkjet ve fleksografik teknolojilerin bir karışımı da kullanılmaktadır. Etken maddeyi çeşitli substratlara yazdırmak için inkjet baskı kullanılırken

fleksografik baskı, ilaç yüklü substratı ince bir polimerik kaplamayla kaplamak için kullanılmaktadır (49).

Yukarıda sıralanan ince filmler için üretim yöntemlerinden çözücü buharlaştırma yöntemi daha ekonomik, tekrarlanabilir ve daha verimlidir.

Çözücü Buharlaştırılması

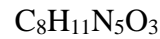
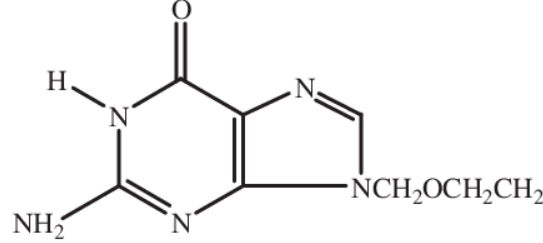
Suda çözünebilir ekşiyanlar, polimerler ve deiyonize suda çözünen ilaçlar kullanılarak filmlerin hazırlanmasına yönelik en tipik yaklaşım, çözücünün buharlaştırılmasıdır. Hazırlanan solüsyon Petri kabına konulur ve solvent yüksek sıcaklıkta kurumaya bırakılır. Kullanılacak etken maddenin, türü, erime sıcaklığı ve polimorfik yapısı gibi temel fizikokimyasal parametrelerine bağlı olarak uygun solventi belirlenir. Formülasyon tamamlanmadan önce ilacın solvent ve diğer yardımcı maddelerle uyumluluğu dikkate alınır. Formülasyon sırasında hava kabarcıklarının hapsolmesi, üretilen filmlerin homojenliğini etkileyebilir. Bu nedenle karışımın havasının alınması gerekmektedir (48). (Şekil 2.6.) (Şekil 2.7.)



Şekil 2. 8. Çözücü buharlaştırma metodu

2.2. Asiklovir

2.2.1. Asiklovirin Fizikokimyasal Yapısı



Şekil 2. 9. Asiklovir'in kimyasal formülü

Asiklovir beyaz renkte olup 2-Amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one olarak isimlendirilir. DMSO'da 45 mg/mL; suda <1 mg/mL; ve etanolde <1mg/mL miktarlarda çözünür. Yaklaşık 260 °C'de erimeye başlar.

2.2.2. Asiklovirin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

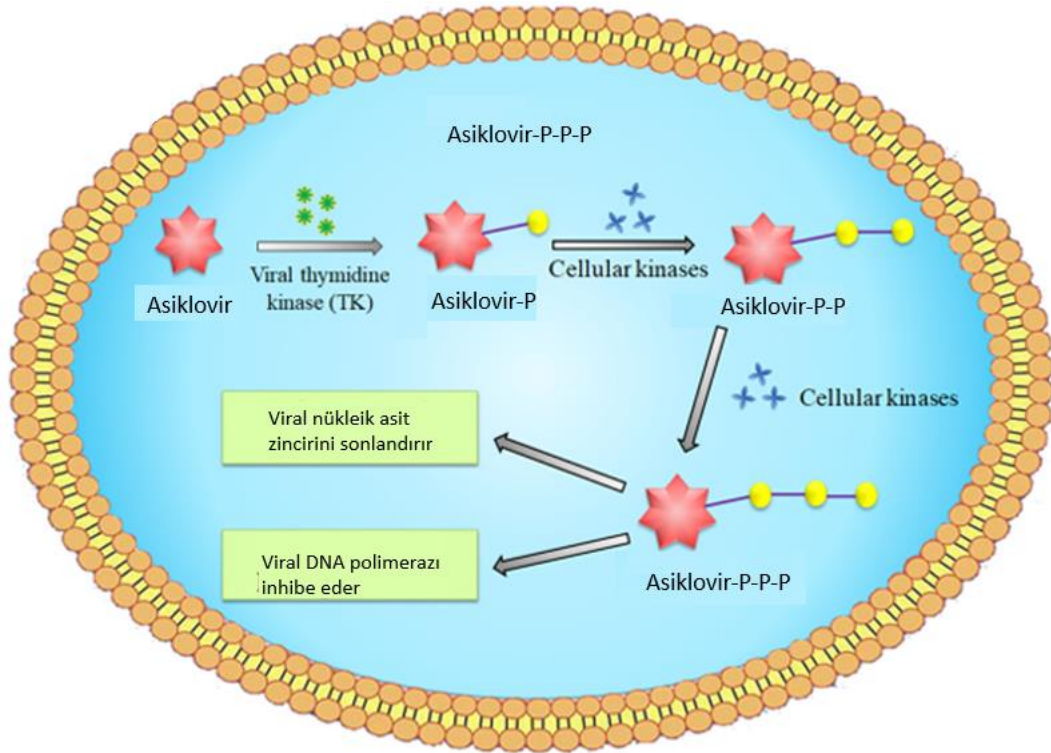
Elde edilen verilere göre asiklovirin plazma konsantrasyon seviyesi yaklaşık %50 civarındadır. İlacın değişmeden böbreklerden atılımı ana eliminasyon yoludur ve dozun %62-91'ini oluşturur ve bu nedenle böbrek yetmezliği için doz ayarlaması gerekir. Ayrıca oral asiklovirin emilimi yavaş ve değişkendir; biyoyararlanımı yalnızca %15-30'dur (35).

2.2.3. Asiklovirin HSV Tedavisinde Kullanımı

ACV, enfekte hücrelerde viral DNA sentezini inhibe ederken sağlıklı hücrelerde herhangi bir etkiye neden olmamaktadır.

Viral replikasyon, viral DNA veya RNA sentezi için hammadde olarak konakçı hücreler tarafından sağlanan nükleotidlere dayanır. Birçok virüs, RNA timin nükleozidini monofosfat nükleozidine dönüştürmek için viral timidin kinazı (TK) kullanabilir. Daha sonra hücre kinazın etkisiyle monofosfat nükleozidi, virüs tarafından kullanılacak difosfat ve trifosfat nükleozidine dönüştürülür. Benzer şekilde,

viral replikasyonun hammaddesi olan antiviral nükleozid ilacı ACV, TK tarafından monofosfat türevlerine dönüştürülür; bu, enfekte olmamış hücrelerde meydana gelmeyen bir reaksiyondur. Monofosfat daha sonra hücresel kinazların kataliziyle difosfata ve aktif trifosfata dönüştürülür. ACV trifosfat, sentezlenen virüsün DNA zincirinde yer alır. Ancak bu bileşiğin virüs tarafından alınması, DNA zincirinin uzamasını bloke eder. Bu, viral nükleik asidin replikasyonunu bloke eden 3'-hidroksil grubunun eksikliğine atfedilmektedir. Ek olarak, ACV trifosfat, viral DNA polimeraza bağlanmak için deoksiguanozin trifosfat (dGTP) ile rekabet etse de viral DNA polimerazın ACV trifosfata afinitesi, dGTP'nikinden çok daha yüksektir, bu da polimerazın viral replikasyon öncülleriyle birleşmesini sağlar ve böylece viral polimerazın aktivitesini inhibe eder. Son olarak viral DNA sentezi ve virüslerin çoğalması engellenir (50). (Şekil 2.3.) (Şekil 2.4.)



Şekil 2. 10. Asiklovir'in etki mekanizması (50).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde	Tedarikçi	Ülke
Asetonitril (HPLC grade)	Sigma Aldrich	ABD
Asetik Asit (% 99)	Isolab	Almanya
Asiklovir	Isolab	Almanya
Kitosan (düşük molekül ağırlıklı, deasetilasyon derecesi (% 75-85))	Sigma Aldrich	ABD
Poliakrilik asit	BLD Pharm	Çin
Sodyum Hidroksit	Riedel-de Haën	Almanya

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz / Ekipman	Marka/Model
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Agilent 1100 Series DAD ve floresans detektörlü, HP Agilent 1050 Series UV detektörlü
Ultra Saf Su Sistemi	Millipore Milli-Q systems
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Variomag Multipoint HP
Termostatlı Yatay Çalkalayıcı Su Banyosu	Memmert
pHmetre	Sartorius
Etüv	Memmer
Hassas Terazî	Mettler
Kompas	Insize
Texture Analyser Cihazı	Stable Microsystems

3.2. Yöntem ve Deneyler

3.2.1. Asiklovirin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Agilent 1100 HPLC aletinde Metformin Hidroklorür maddesi için geliştirilmiş olan metodun özellikleri şu şekildedir:

Mobil faz: Su : Asetonitril (95:5 h/h)

Mobil faz akış hızı: 1 mL/dk

Sabit faz: Chromasil C18 Kolon (250 x 4.6 mm)

Enjeksiyon hacmi: 40 µL

Dedektör: DAD dedektör 254 nm

Kolon sıcaklığı: 30 °C

Analiz süresi: 10 dakika

Asiklovir alıkonma süresi: 5.0 dk

3.2.2. Kalibrasyon

Asiklovir'in kalibrasyon doğrusu için 100 ppm konsantrasyonda su ile hazırlanan Asiklovir stok çözeltisinden hareketle 1, 2, 5, 10, 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda 6'şar çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0,45 µm PTFE filtreden geçirilerek HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi, hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirililmesiyle doğrusal regresyon ile hesaplanmıştır.

3.2.3. Analitik Yöntem Validasyonu

- **Doğrusallık**

Doğrusallık için 100 ppm konsantrasyonda stok çözeltiden hareketle her birinde 1, 2, 5, 10, 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmış ve 0,45 µm PTFE filtreden geçirilerek HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyona karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek doğru denklemi incelenmiş ve r^2 değeri hesaplanarak yöntemin doğrusallığı gösterilmiştir.

- **Doğruluk**

Analitik yöntemin doğruluğunun test edilmesi için amacıyla, kalibrasyon sınırları içindeki en düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda (1, 10 ve 100 ppm) 6'şar çözelti hazırlanarak HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucunda Asiklovir'in geri kazanım değerleri ve bu değerlere ait X, SS ve VK hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması beklenmektedir.

- **Kesinlik**

Tekrar Edilebilirlik

Hazırlanan 100 ppm Asiklovir stok çözeltisinden hareketle, 10 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltinin 6 kez ardı ardına HPLC ile analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda X, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması yöntemin doğruluğunun göstergesidir.

Tekrar Elde Edilebilirlik

Kullanılan yöntemin tekrar elde edilebilirliğini değerlendirmek amacıyla 100 ppm Asiklovir stok çözeltisinden seyreltilerek 10 ppm konsantrasyonunda 6 adet çözelti hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda X, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması yöntemin doğruluğunun göstergesidir.

- **Günler Arası Farklılık**

Günler arası farklılık parametresinin değerlendirilmesi amacıyla, 10 ppm konsantrasyonda 3 gün ardı ardına çözeltiler hazırlanmış ve HPLC ile analizi yapılmıştır ve X, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması beklenmektedir.

- **Duyarlılık**

Kullanılan yöntemin duyarlılığını değerlendirmek için tanıma sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri incelenmiştir. LOD ve LOQ, daha önceden

oluşturulmuş olan kalibrasyon doğrusundaki en düşük konsantrasyon değeri olan 1 ppm konsantrasyonda çalışılmıştır. LOD için sinyal/gürültü oranının 3.3, LOQ için ise 10 olduğu değer belirlenmiştir.

- **Özgünlük**

Geliştirilen analitik yöntemin Asiklovirin tanınmasına özgün olduğunun belirlenmesi için formülasyondaki diğer maddelerin Asiklovir ile bir girişim yapıp yapmadığına bakılmış ve HPLC analizi ile yöntemin özgünlüğü test edilmiştir.

- **Stabilite**

Analiz süresince Asiklovir'in stabil olduğunu göstermek amacıyla 10 ppm konsantrasyonda hazırlanan Asiklovir çözeltisi ile 24 saat sonra kalan miktar HPLC ile belirlenmiştir.

3.2.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Boş Kitosan/Poliakrilik Asit (CS/PAA) Film Formülasyonları Hazırlanması ve Optimizasyonu

Boş CS/PAA film formülasyonları için, düşük molekül ağırlıklı kitosan ve poliakrilik asit (molekül ağırlığı (MW): 450000 g/mol) ile çalışılmıştır. Formülasyonlar çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları için 10 mL %1, %5 ve %10 (h/h) konsantrasyonlarında asetik asit çözeltileri içerisine farklı konsantrasyonlarda poliakrilik asit (%1.5, %1.2, %1, %0.75, %0.5, %0.2, %0.1 a/a olacak şekilde) eklenip 500 rpm'de 10 dakika karıştırılmıştır. Sonra farklı konsantrasyonlarda kitosan (%2, %1.5, %1, %0.5 a/a olacak şekilde) karışıma ilave edilmiş ve 24 saat 500 rpm'de manyetik karıştırıcıda ağzı kapalı şekilde karıştırmaya bırakılmıştır. Daha sonra hazırlanan çözeltiler petri kaplarına dökülmüş ve 40 °C etüvde 24 saat kurumaya bırakılmıştır.

Tablo 3.1. Boş CS/PAA film formülasyonlarında kullanılan PAA ve CS'a ait konsantrasyon değerleri.

PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)
		0,1	1				
		0,2	1				
0,5	0,5	0,5	1	0,5	1,5	0,5	2
0,75	0,5	0,75	1	0,75	1,5	0,75	2
1	0,5	1	1	1	1,5	1	2
1,2	0,5	1,2	1	1,2	1,5	1,2	2
1,5	0,5	1,5	1	1,5	1,5	1,5	2

Farklı konsantrasyonlarla hazırlanan boş CS/PAA içeren film formülasyonlarının film oluşturma yetenekleri incelenerek dolu CS/PAA içeren film formülasyonlarının tasarım çalışmaları için konsantrasyon aralığı belirlenmiştir.

Asiklovir (ACY) Yüklü Kitosan/Poliakrilik Asit (CS/PAA) Film Formülasyonları Hazırlanması ve Optimizasyonu

ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları, boş CS/PAA film formülasyonlarının hazırlanması için belirlenen konsantrasyon değerleri kullanılarak çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. (CS %1.2, %1, %0.8 a/a olacak şekilde ve ve PAA (%0.8, %0.6, %0.4 a/a olacak şekilde) optimizasyon çalışmaları için 10 mL %10 h/h asetik asit içerisine önce farklı konsantrasyonlarda PAA (%1.5, %1.2, %1, %0.75, %0.5, %0.2, %0.1 a/a olacak şekilde) eklenip 500 rpm'de 10 dakika karıştırılmıştır. Karışımın içerisinde %5 (a/a) konsantrasyonda Asiklovir eklenerek çözünene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda CS (%2, %1.5, %1, %0.5 a/a olacak şekilde) karışıma ilave edilmiş ve 24 saat 500 rpm'de manyetik karıştırıcıda ağzı kapalı şekilde karıştırmaya bırakılmıştır. Daha sonra hazırlanan çözeltiler petri kaplarına dökülmüş ve 40 °C etüvde 24 saat kurumaya bırakılmıştır.

Tablo 3.2. Asiklovir yüklü CS/PAA film formülasyonlarında kullanılan PAA ve CS konsantrasyonları (Asiklovir %5 a/a, Asetik Asit % 10 h/h).

PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)
0.8	1.2	0.8	1	0.8	0.8
0.6	1.2	0.6	1	0.6	0.8
0.4	1.2	0.4	1	0.4	0.8

Farklı konsantrasyonlarla hazırlanan ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları için şişme, parçalanma, adezyon kuvveti ve mekanik özellik (% uzama, gerilme direnci, elastik modülü) analizleri yapılmıştır (n=6). Analiz sonuçları 3 seviyeli tepki yüzey metodu ile değerlendirilerek optimum CS ve PAA konsantrasyonu belirlenmiştir.

Faktöriyel Tasarım

Faktöriyel tasarım, sistem optimizasyonunda kullanılan bir grup istatistiksel ve matematiksel teknikten meydana gelmektedir. Bu teknik sayesinde bağımsız değişkenlerin tek veya interaksiyon halinde, proses üzerindeki etkilerini açıklayabilmek mümkündür.

Boş CS/PAA film formülasyonları ile yapılan deneyler sonucu belirlenen konsantrasyon değerleri ile ANOVA sistemi ve faktöriyel tasarım kullanılarak optimum CS/PAA oranı elde edilmiş olup tasarım şeması Tablo 3.2.'te gösterilmektedir.

Tablo 3.3. Faktöriyel Tasarım

Çalışma Tipi	Tepki Yüzeyi	Alt-tip	Randomize edilmiş
Dizayn Tipi	3 Seviyeli	Örneklem Sayısı	9
Dizayn Modeli	İkinci dereceden	Blok	Hayır
Kurulum Süresi (ms)	2.00		

3.2.5 Hazırlanan Mukoadezif Film Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu

Faktöriyel tasarım ile elde edilen optimum bos ve ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları için in vitro karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Fiziksel Görünüm Analizi

Boş CS/PAA film formülasyonları ve ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları fiziksel görünüm, renk, doku ve şeffaflık açısından görsel olarak değerlendirilmiştir.

Film Ağırlık ve Kalınlık Tekdüzeliği Tayini

Hazırlanan filmlerin ağırlık ve kalınlık değişkenliklerini değerlendirmek amacıyla 6 farklı örnek üzerinden ağırlık ve kalınlık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. 1x1 cm'lik parçalar halinde kesilen filmlerin hassas terazi kullanılarak ağırlıkları değerlendirilmiştir. Ardından filmlerin farklı konumlarda tutulan bir kompas yardımıyla kalınlıkları ölçülerek ortalama ağırlık ve kalınlık değerleri, standart sapmaları hesaplanmıştır.

Katlanma Dayanıklılığı Tayini

Hazırlanan film formülasyonlarının katlanma dayanıklılığı tayini için her bir film kırılıncaya kadar aynı yerden tekrar tekrar katlanmıştır. Katlama işlemi aynı noktadan ve düzlemlerle 180°'lik açı oluşturacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 6 örnek ile çalışılarak sonuç, ortalama ve standart sapma olarak hesaplanmıştır.

pH Ölçümü

Hazırlanan film formülasyonlarının yüzey pH'sını analiz etmek amacıyla filmler 5 mL pH 6,8 fosfat tamponunda 30 dakika şişmeye bırakılmalarının ardından yüzeylerindeki fazla sıvı alınarak pHmetre ile pH değerleri ölçülmüştür (n=6).

İlaç İçeriği Tekdüzeligi

Asiklovirin film formülasyonlarında ilaç içeriği tekdüzeliği tayini gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan filmler tartılarak parçalara ayrılmış ve 50 mL'lik behere, konulmuştur. Ardından asiklovirin tamamen çözünmesi için çözücü olarak distile su eklenerek vortekslenmiş ve 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından çözelti 10 000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve 0,22 µm PTFE filtreden süzülerek HPLC'de miktar tayini analizi gerçekleştirilmiştir.

Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Film formülasyonları, asiklovir ve formülasyon bileşenlerinin kendi aralarında olan etkileşimini incelemek amacıyla FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için ACY, CS, PAA ile ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları ve boş CS/PAA film formülasyonları üzerinde çalışılmıştır. Ölçümlerden önce bir pelet oluşturmak için manuel bir pres kullanılarak (1-2 mg) numuneler potasyum bromür (KBr) ile preslenmiş ve fourier transform kızılötesi spektrofotometre cihazı kullanılarak 4 cm^{-1} çözünürlükte 450 cm^{-1} 'den 4000 cm^{-1} 'e kadar kaydedilmiştir.

DSC Analizi

Film formülasyon bileşenlerinin ve film formülasyonlarının termal özelliklerinin belirlenmesi ve etkin maddelerin ile etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla DSC analizi yapılmıştır. Hangi maddeleri çektik eklemelisin. Katı numuneler için sırasıyla alüminyum pan kullanılmış olup analizler 10 °C/dk ısıtma hızıyla $50\text{--}300\text{ °C}$ 'de gerçekleştirilmiştir.

Morfolojik Analiz

Boş CS/PAA film formülasyonları ve ACY yüklü CS/PAA film formülasyonlarının yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelenmiştir. Metal plakalara sabitlenen filmler 100 Å kalınlığında altın-palladyum alaşımı ile kaplanmış ve FIB-SEM (GAIA3 +Oxford XMax 150 EDS) aleti ile 30 kV hızlandırılmış voltajda fotomikrograflar görüntülenmiştir.

Şişme Analizi

Film formülasyonlarının şişme özellikleri hidrasyon (su alımı) yüzdesi belirlenerek değerlendirilmiştir. Filmler 1x1 cm boyutlarında kesilip tartılmış (W1 - kuru ağırlık) ve pH 6,8 fosfat tamponu içeren petri kabına yerleştirilerek yaklaşık 15 mL hacimdeki pH 6,8 fosfat tamponu içine daldırılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 dakika) filmler ortamdan çıkarılarak bir kağıt mendil ile fazla suyu silinmiş ve ardından tekrar tartılmıştır (W2 - ıslak ağırlık). Yüzde şişme değeri S(%) aşağıda yer alan eşitlikle hesaplanmıştır.

$$S(\%) = [(W2 - W1)/W1]*100$$

Parçalanma Analizi

Film formülasyonlarının parçalanma analizi petri kabı yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filmler 1x1 cm boyutlarında kesilip tartılmış (W1), petri kaplarına alınarak 5 mL pH 6,8 fosfat tamponuna yerleştirilmiş ve 37°C'de sıcaklıkta çalkalanmıştır. Belirli zaman aralıklarında (1, 6 ve 12 saat) örnekler çıkarılarak kurutmaya bırakılmış ve ağırlıkları ölçülmüştür (W2) (n=6). Yüzde parçalanma değeri aşağıda yer alan eşitlikle hesaplanmıştır.

$$P(\%) = [(W1 - W2)/W1]*100$$

Adhezyon Kuvvetinin Ölçülmesi

Mukoadhezif polimerlerle hazırlanmış olan film formülasyonunun adhezyon kuvvetinin ölçüsünü belirlemek amacıyla literatürde yer alan doku analizörü cihazı olan Texture Analyser cihazı (TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK) kullanılmıştır. İn vitro adezyon çalışmaları için cihaz 500 g ağırlığı ve çıkarılabilir alüminyum prob kullanılarak ayarlanmıştır. Ardından örnekler bir yapıştırıcı yardımıyla çıkarılabilir prob üzerine tutturulmuş ve prob 0,1 mms-1 sabit hızda ve 0,2 N sabit kuvvette, deneyden önce bir gece pH 6,8'lik fosfat tamponunda bekletilmiş diyaliz membranı yüzeyine indirilmiştir. 60 saniyelik temas süresinin ardından prob yukarı doğru hareket ettirilmiştir ve adhezyon kuvveti; zamana karşı kuvvet eğrisinin eğri altı alanından

hareketle hesaplanmıştır. Aşağıda verilen denklemlerle eğri altı alan kullanılarak adhezyon kuvveti (mJ/cm^2) cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Adhezyon (mJ/cm}^2\text{)} = \text{AUC} / \pi r^2$$

Mekanik özellikler

Hazırlanan film formülasyonlarının mekanik özellikleri, Texture Analyser cihazı (TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK) kullanılarak analiz edilmiştir. Gerilme direnci, elastik modülü ve % uzama ölçülmüştür.

$$\% \text{ Uzama} = \text{Uzunluktaki artış} \times 100 / \text{Filmin başlangıç uzunluğu}$$

$$\text{Gerilme direnci (N/mm}^2\text{)} = \text{Kopma kuvveti} \times 100 / \text{filmin başlangıç kesit alanı}$$

$$\text{Elastik modülü (N/mm}^2\text{)} = \text{Gerilme direnci} / (\text{Uzama miktarı} / \text{Filmin başlangıç uzunluğu})$$

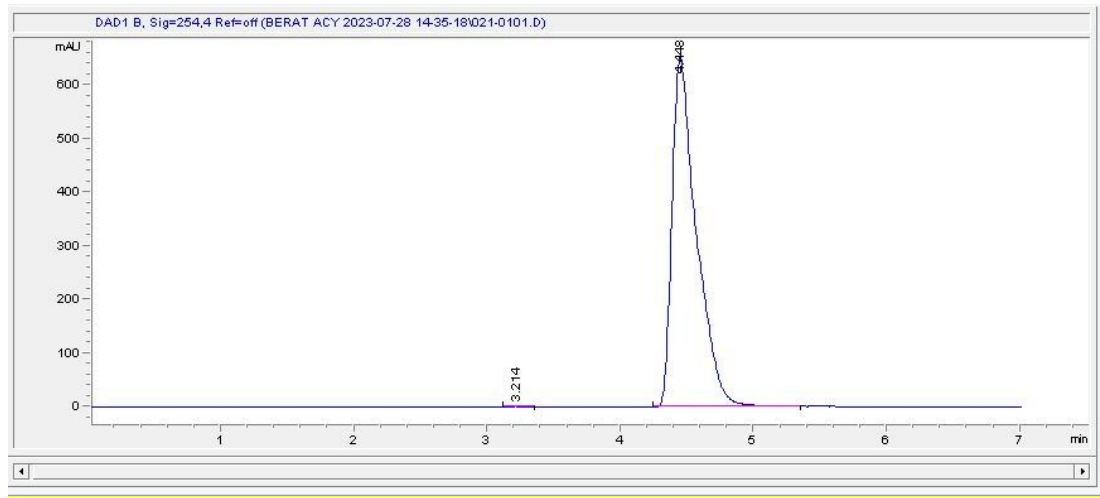
İn Vitro Salım Çalışmaları

Asiklovir yüklü film formülasyonlarının in vitro salım deneyleri için hazırlanan bir film formülasyonu 50 mL'lik flakona koyularak ve içerisine 50 mL pH 6,8 fosfat tamponu salım ortamı olarak eklenmiştir. 37°C'de yatay çalkalayıcılı su banyosunda belirli zaman aralıklarında (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 saat) 1 mL örnek alınıp yerine 1mL salım ortamı eklenmiştir. Belirli zaman aralıklarında alınan örnekler seyreltilip 0.22 μm PTFE filtreden süzülerek HPLC'de analizler gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Asiklovirin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Asiklovir'in HPLC ile in vitro miktar tayini Bölüm 3.2.1'de belirtilen metot ile yapılmıştır. Asiklovir piki 254 nm'de yapılan dedeksiyonu sonucu 5. dakikada saf olarak elde edilmiştir (Şekil 4.1.).



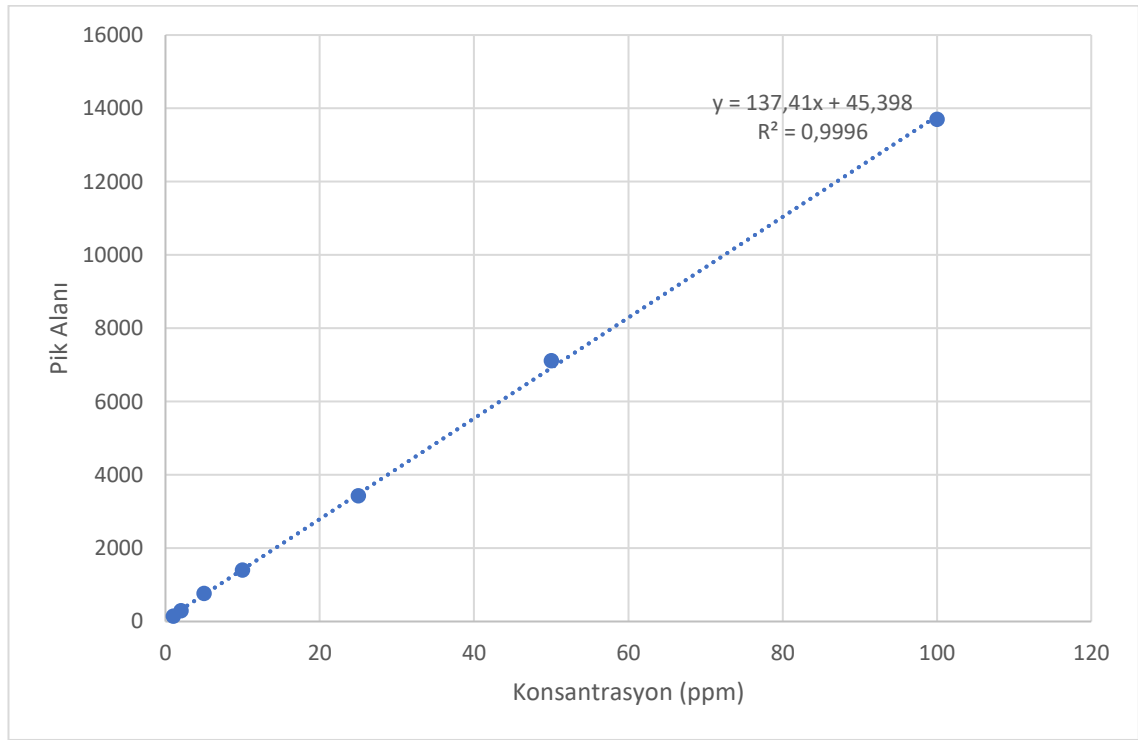
Şekil 4. 1. Asiklovir'e (100 ppm) ait HPLC kromatogramı.

4.2. Kalibrasyon

Asiklovir'in kalibrasyon doğrusu Bölüm 3.2.2.'de belirtilen metot ile gerçekleştirilmiştir. 100 ppm konsantrasyonda hazırlanan Asiklovir stok çözeltiden hareketle her birinde 1, 2, 5, 10, 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi, hazırlanan çözeltilerin enjeksiyonundan sonra HPLC yöntemi ile çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek doğrusal regresyon ile bulunmuştur. Asiklovir'in HPLC ile miktar tayininde elde edilen doğrusal regresyon verileri Tablo 4.2.'de gösterilmekte olup kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.2.'de yer almaktadır.

Tablo 4. 1. Asiklovir'in HPLC ile miktar tayininde elde edilen lineer regresyon verileri.

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon Aralığı	1 – 100 ppm
Eğim	137,41
İntersept	45,398
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9996



Şekil 4. 2. Asiklovir'in kalibrasyon doğrusu ve denklemleri.

4.3. Analitik Yöntem Validasyonu

- Doğrusallık

Yöntemin doğrusallık analizleri Bölüm 3.2.2.'de belirtilen metot ile gerçekleştirilmiştir. 100 ppm konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltilerden hareketle 1,5, 3, 6, 12,5, 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış ve HPLC ile

analiz edilmiştir. Asiklovir'in farklı konsantrasyonlardaki absorbanları hesaplanmış ve kalibrasyon doğrusu denklemi elde edilmiştir. Denklemin doğrusallığını belirleyen tanımlayıcılık katsayısı (r^2) değeri 0,9996 olduğu bulunmuş ve yöntemin doğrusal olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.2).

- **Doğruluk**

Analitik yöntemin doğruluk analizi Bölüm 3.2.2.'de belirtilen metot ile gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon sınırları içindeki düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda (1, 10 ve 100 ppm) 6 seri çözelti hazırlanarak HPLC analizi yapılmıştır. Ölçüm sonucunda Asiklovir'in geri kazanım değerleri ve bu değerlere ait X, SS ve VK hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısı bütün konsantrasyonlar için %2'den küçük bulunmuştur (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Asiklovir'in geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayısı değerleri.

Doğruluk			
Örnek	1 ppm % Geri Kazanım	10 ppm % Geri Kazanım	100 ppm % Geri Kazanım
1	68,00	99,96	98,81
2	67,20	99,04	99,88
3	69,24	99,25	100,80
4	69,38	97,84	99,93
5	67,71	98,78	98,17
6	66,62	95,14	98,63
X	68,02	98,34	99,37
SS	1,00	1,56	0,90
VK	1,47	1,58	0,91

- **Kesinlik**

Tekrar Edilebilirlik

Kullanılan yöntemin tekrar edilebilirliğinin değerlendirilebilmesi için 100 ppm stok çözeltilerden 10 ppm konsantrasyonda tek bir çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti ile 6 kez HPLC analizi yapılmıştır. Varyasyon katsayısı %2'den küçük bulunmuştur (Tablo 4.4.).

Tablo 4.3. Asiklovir'in tekrar edilebilirlik sonuçları.

Tekrar	Konsantrasyon (ppm)	X	SS	VK %
1	9,85	9,88	0,09	0,95
2	9,99			
3	9,92			
4	9,83			
5	9,95			
6	9,73			

Tekrar Elde Edilebilirlik

Asiklovir miktar tayini yönteminin tekrar elde edilebilirliğinin değerlendirilebilmesi için 100 ppm stok çözeltilerden hareketle 10 ppm konsantrasyonda 6 farklı çözelti hazırlanmış ve HPLC ile analiz yapılmıştır. Varyasyon katsayısı %2'den küçük bulunmuştur (Tablo 4.5.).

Tablo 4.4. Asiklovir'in tekrar elde edilebilirlik sonuçları.

Numune	Konsantrasyon (ppm)	X	SS	VK %
1	9,99	9,83	0,17	1,74
2	9,90			
3	9,92			
4	9,78			

5	9,87		
6	9,51		

Günler Arası Farklılık

Günler arası farklılık parametresinin değerlendirilebilmesi için ard arda 3 gün 10 ppm konsantrasyonda 3 farklı çözelti hazırlanmış ve hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi yapılmıştır. X, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olduğu görülmüştür. (Tablo 4.6.)

Tablo 4.5. Asiklovir'in günler arası farklılık sonuçları.

Numune	Konsantrasyon (ppm)	X	SS	VK %
1	10,23	10,29	0,12	1,17
2	10,21			
3	10,42			

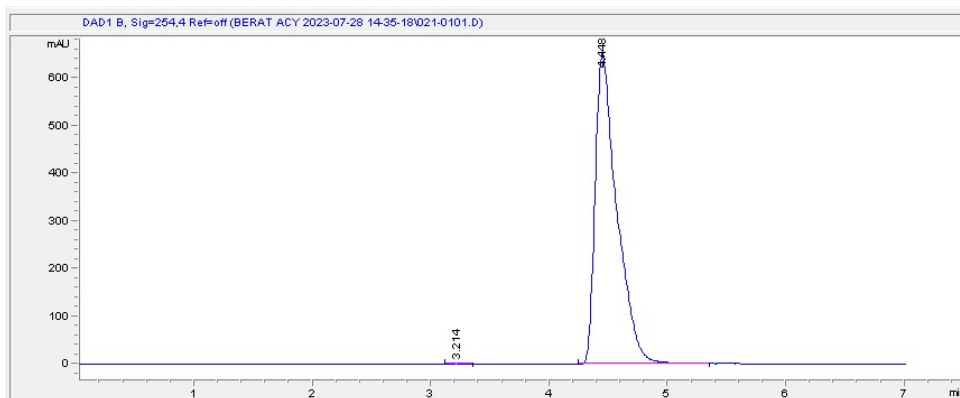
Duyarlılık (Tanıma Sınırı (LOD) ve Alt Tayin Sınırı (LOQ) Değerlerinin Hesaplanması)

Asiklovir'in HPLC ile miktar tayininde kullanılan yöntemin duyarlılığı çalışılan en düşük konsantrasyon olan 1 ppm konsantrasyonda hesaplanmıştır. LOD (tanıma sınırı) 0,036 ppm ve LOQ (alt tayin sınırı) ise 0,11 ppm olarak belirlenmiştir (Tablo 4.6.).

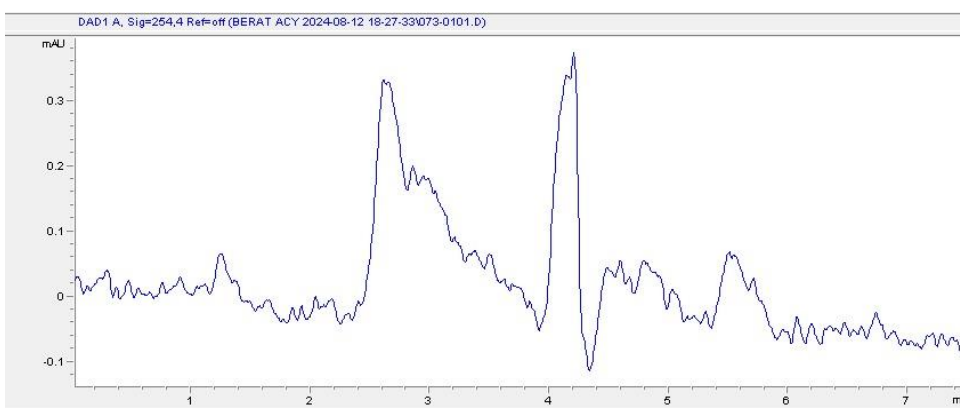
Özgünlük

Geliştirilen analitik yöntemin Asiklovir için özgün olduğunun gösterilebilmesi için formülasyondaki diğer maddelerin Asiklovir ile bir girişim yapıp yapmadığına bakılmış ve formülasyondaki her bir madde için HPLC kromatogramı elde edilmiştir (Şekil 4.3.).

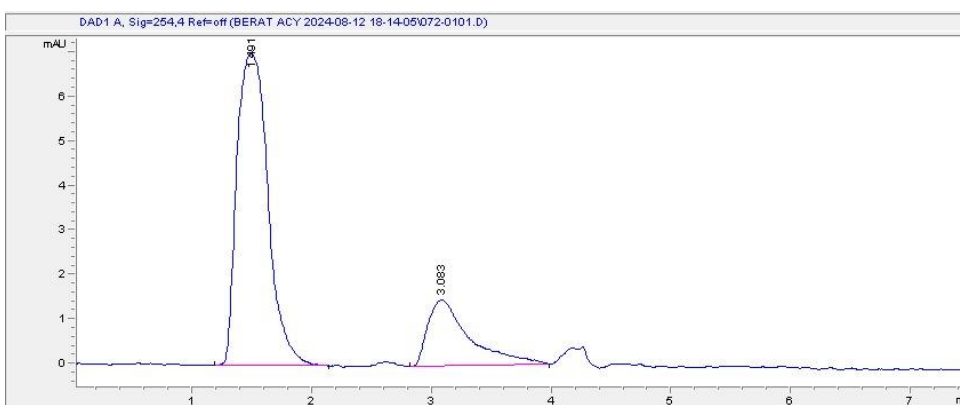
a.



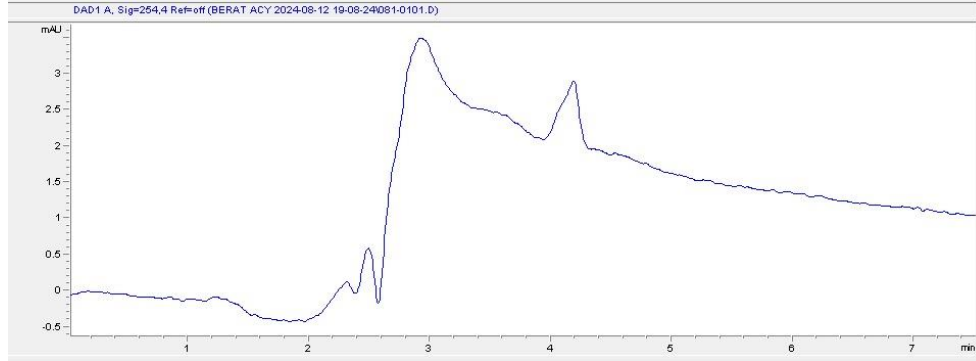
b.



c.



d.



Şekil 4. 3. Asiklovir, Kitosan ve Poliakrilik Asit'in HPLC spektrumlarının karşılaştırılması. (a.Asiklovir, b.Kitosan, c.Poliakrilik Asit, d.pH 6.8 tampon),.

Stabilite

10 ppm konsantrasyonda hazırlanan 3 farklı Asiklovir çözeltisi oda koşullarında 24 saat bekletildikten sonra HPLC analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda başlangıç konsantrasyonunun %99'u ($\pm 0,5$) tayin edilmiş ve Asiklovir'in stabil olduğu görülmüştür (Tablo 4.6.). Ayrıca tez çalışmasında kullanılan HPLC yöntemi ile herhangi bir bozunma ürününe ait pike rastlanmamıştır.

Tablo 4.6. Asiklovir'in 24 Saatlik Stabilite Ölçümleri

Numune (10ppm)	0. saat (absorbans)	24. Saat (absorbans)	% Geri Kazanım
1	1450,4	1428,9	98,51
2	1448,4	1437	99,21
3	1464,7	1456,1	99,41

4.4. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Boş CS/PAA Film Formülasyonları Hazırlanması ve Optimizasyonu

Boş CS/PAA film formülasyonları için optimizasyon çalışmaları Bölüm 3.2.4.'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. Boş CS/PAA film formülasyonlarında kullanılan PAA ve CS'a ait konsantrasyon değerleri.

PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)
		0,1	1				
		0,2	1				
0,5	0,5	0,5	1	0,5	1,5	0,5	2
0,75	0,5	0,75	1	0,75	1,5	0,75	2
1	0,5	1	1	1	1,5	1	2
1,2	0,5	1,2	1	1,2	1,5	1,2	2
1,5	0,5	1,5	1	1,5	1,5	1,5	2

Hazırlanan boş CS/PAA film formülasyonlarının film oluşturabilme yetenekleri incelenmiştir. Kitosan, %1.5 ve üzeri a/a konsantrasyonda formülasyona ilave edildiğinde formülasyonun çok viskoz olması nedeniyle film çözeltisinin karışmasına olanak vermediği görülmüştür. %0.5 (a/a) konsantrasyonda CS kullanılarak hazırlanan formülasyonların film oluşturma yeteneğinin oldukça zayıf olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle kitosanın kullanım yüzdesi için aralık %0.8-%1.2 (a/a) olarak belirlenmiştir. %1 ve üzeri konsantrasyonda poliakrilik asit kullanılan formülasyonlarda viskozitede aşırı artış ve kitosan ile topaklanma meydana geldiği gözlenmiştir. Bu nedenle PAA'nın kullanım yüzdesi için aralık %0.6-%0.8 (a/a) olarak belirlenmiştir.

ACY Yüklü CS/PAA Film Formülasyonları Hazırlanması ve Optimizasyonu

ACY yüklü CS/PAA film formülasyonlarda optimizasyon çalışmaları için Bölüm 3.2.4.'te açıklandığı üzere farklı konsantrasyonlarla hazırlanan boş CS/PAA film formülasyonlarının film oluşturma yetenekleri incelenerek belirlenen farklı

konsantrasyonlardaki Kitosan (%1.2, %1, %0.8 a/a olacak şekilde) ve Poliakrilik Asit (%0.8, %0.6, %0.4 a/a olacak şekilde) ile çalışılmıştır. Formülasyonlar çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları için 10 ml %10 h/h asetik asit içerisine önce farklı konsantrasyonlarda PAA (%1.5, %1.2, %1, %0.75, %0.5, %0.2, %0.1 a/a olacak şekilde) eklenip 500 rpm’de 10 dakika karıştırılmıştır. Karışımın içerisinde %5 a/a oranında Asiklovir eklenerek çözünene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda CS (%2, %1.5, %1, %0.5 a/a olacak şekilde) karışıma ilave edilmiş ve 24 saat 500 rpm’de manyetik karıştırıcıda ağzı kapalı şekilde karıştırmaya bırakılmıştır. Hazırlanan çözeltiler petri kaplarına dökülerek etüvde 40 °C’de 24 saat kurumaya bırakılmıştır (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları hazırlanmasında kullanılan CS ve PAA konsantrasyon değerleri (Asiklovir %5 a/a).

PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)	PAA %(a/a)	Kitosan %(a/a)
0.8	1.2	0.8	1	0.8	0.8
0.6	1.2	0.6	1	0.6	0.8
0.4	1.2	0.4	1	0.4	0.8

Tablo 4.8’de verilen konsantrasyon değerleri kullanılarak hazırlanan ACY yüklü CS/PAA film formülasyonlarına şişme, parçalanma, adezyon kuvveti ve mekanik özellik (% uzama, gerilme direnci, elastik modülü) analizleri yapılmıştır (n=6). Analiz sonuçları 3 seviyeli faktöriyel tasarım metodu ile değerlendirilerek optimum CS ve PAA konsantrasyonu belirlenmiştir.

Faktöriyel Tasarım

Belirlenen CS ve PAA konsantrasyonları ile ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları hazırlanmış ve hazırlanan filmler için şişme, parçalanma, adezyon kuvveti ve mekanik özellik (% uzama, gerilme direnci, elastik modülü) analizleri yapılmış ve bu analizler sonucu elde edilen veriler sisteme girilmiştir (Tablo 3.4.).

Tablo 4.9. Faktöriyel tasarım için kullanılan bağımsız değişkenler ve tasarım için kullanılan analiz verileri

Örneklem	CS	PAA	Adezyon Kuvveti	Elastik Modülü	Şişme	Parçalanma
	%	%				
1	1.2	0.8	116.76	442.78	64	8.45
2	1.2	0.6	112.55	397.22	71	9.06
3	1	0.4	74.57	150.71	68	8.76
4	1	0.8	86.48	220.97	56	7.81
5	0.8	0.6	48.14	96.86	50	7.69
6	0.8	0.8	55.63	109.2	46	7.29
7	1	0.6	80.52	176.42	63	8.38
8	0.8	0.4	41.48	91.31	56	7.98
9	1.2	0.4	107.78	334.2	78	9.53

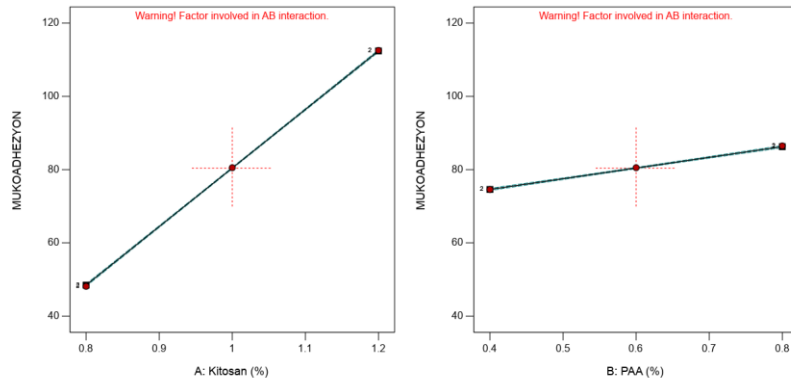
Tablo 4.10. elde edilen yanıtlara ait ANOVA sonuçlarını göstermekte olup, model p değerlerinin şişme, parçalanma, adezyon kuvveti ve gerilme direnci için genel anlamda 0.0001'den küçük olduğu görülmektedir. Bu da seçilen tüm bağımsız değişkenlerin anlamlı olduğunu ve kullanılan modelin deneysel değerlerin tahmini için uygun bir model olabileceğini göstermektedir.

Tablo 4.10. Yanıtlar (şişme, parçalanma, adezyon kuvveti ve mekanik özellik) için ANOVA sonuçları

Source	Adezyon Kuvveti (2FI)		Elastik Modülü (İkinci dereceden)		Şişme (Lineer)		Parçalanma (2FI)	
	F değeri	p değeri	F değeri	p değeri	F değeri	p değeri	F değeri	p değeri
Model	43639.29	< 0.0001	664.27	< 0.0001	255.10	< 0.0001	508.33	< 0.0001
CS	1.26E+05	< 0.0001	2944.76	< 0.0001	378.41	< 0.0001	1045.85	< 0.0001
PAA	4222.20	< 0.0001	148.32	0.0012	131.80	< 0.0001	464.82	< 0.0001
CS.PAA	137.87	< 0.0001	46.93	0.0064	NA	NA	14.33	0.0128
CS.CS	NA	NA	181.24	0.0009	NA	NA	NA	NA
PAA.PAA	NA	NA	0.1154	0.7565	NA	NA	NA	NA
R2 (Tahmini)	0,9998	NA	0.9909	NA	0.9727	NA	0.9911	NA
R2 (hesaplanmış)	0,9999	NA	0.9976	NA	0.9845	NA	0.9948	NA

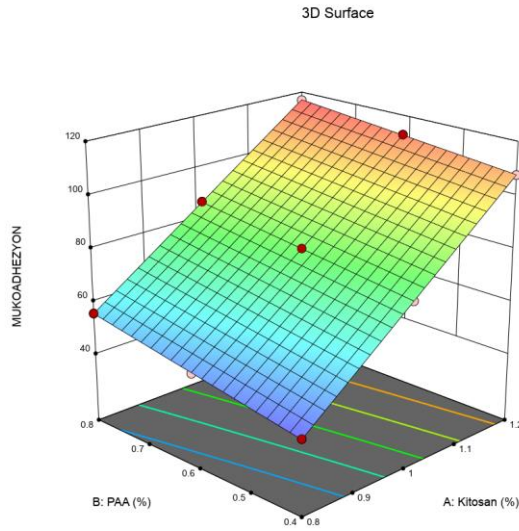
Adezyon kuvveti yanıtına ait sonuçlar incelendiğinde; Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'teki grafikler formülasyondaki CS ve PAA konsantrasyonunun artışı ayrı ayrı ve birlikte adezyon kuvvetinin arttığını göstermektedir.

Factor Coding: Actual
 Response: MUKOADHEZYON
 ● Design Points
 --- 95% CI Bands
 Actual Factors:
 A = 1
 B = 0.6



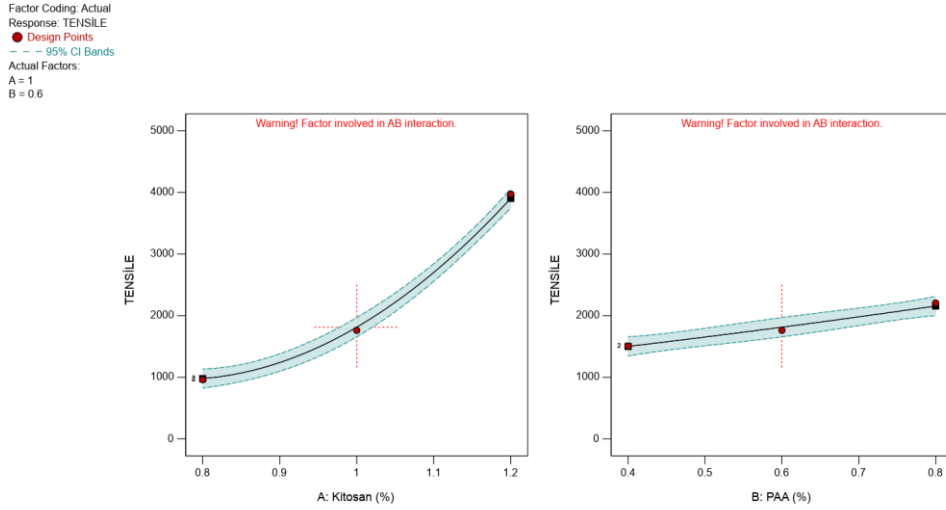
Şekil 4.4. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı adezyon kuvveti üzerine etkisi

Factor Coding: Actual
 Response: MUKOADHEZYON
 Design Points:
 ● Above Surface
 ○ Below Surface
 41.48 116.76

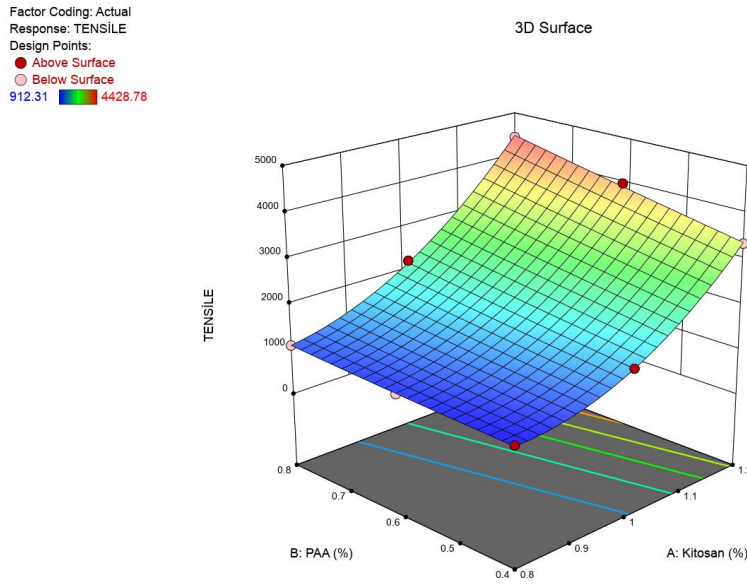


Şekil 4.5. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin birlikte adezyon kuvveti üzerine etkisi

Mekanik Özellik Yanıtına Ait Sonuçlar incelendiğinde Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'teki grafikler formülasyondaki CS ve PAA konsantrasyonunun artışı ayrı ayrı ve birlikte mekanik özelliklerin (elastik modülü) arttığını göstermektedir.



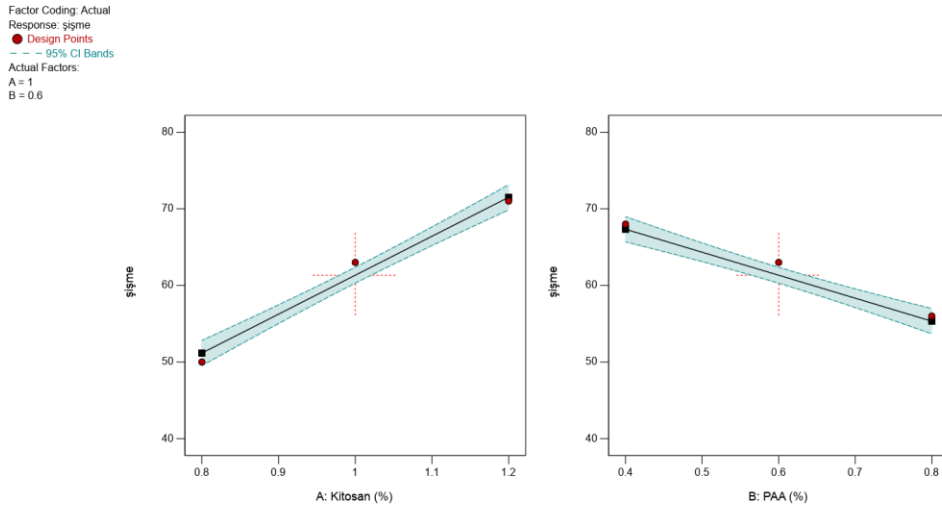
Şekil 4.6. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı mekanik özellik (gerilme direnci) üzerine etkisi



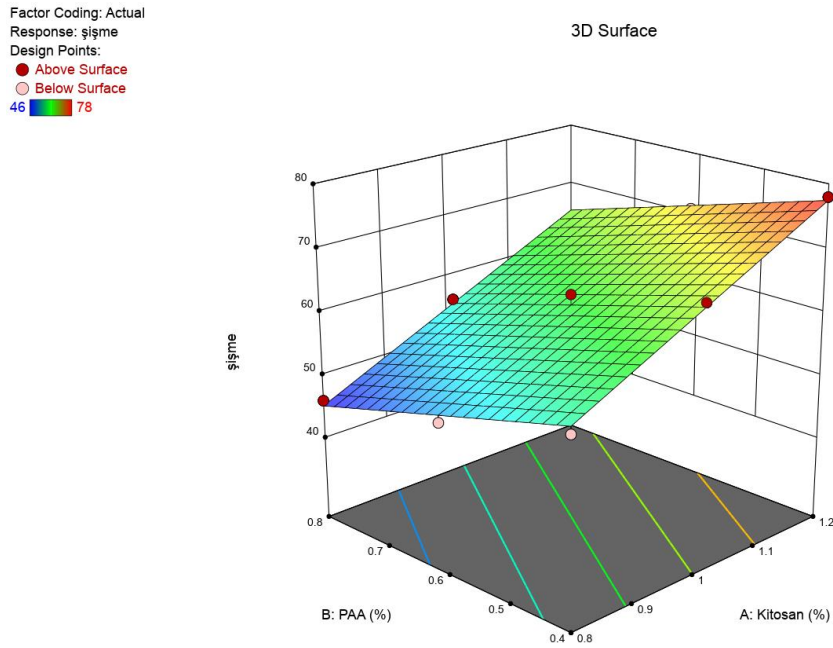
Şekil 4.7. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin birlikte mekanik özellik (gerilme direnci) üzerine etkisi

Şişme yanıtına ait sonuçlar incelendiğinde Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'daki grafikler formülasyondaki CS konsantrasyonunda artışın şişme özelliğinde artış

sağlarken, PAA konsantrasyonunda artışın şişme özelliklerinde düşüşe neden olduğu görülmektedir.

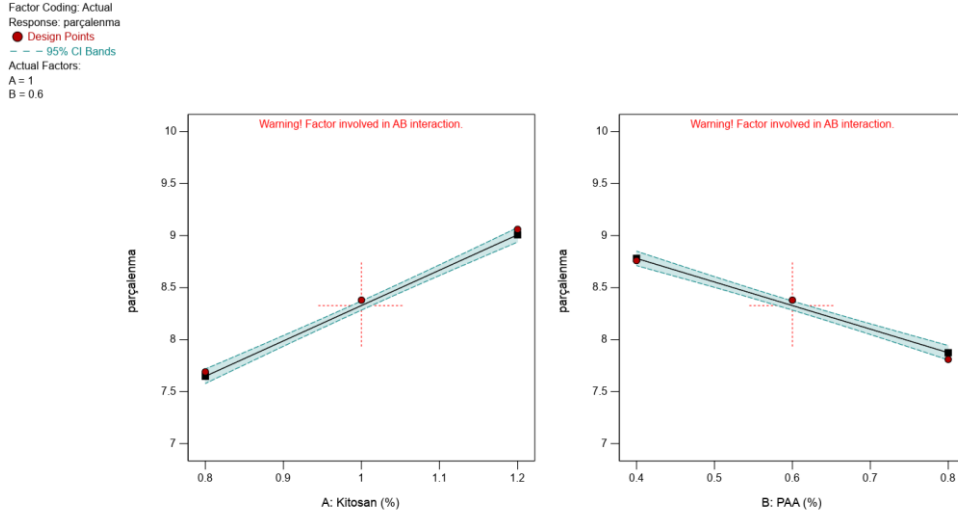


Şekil 4.8. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı şişme üzerine etkisi

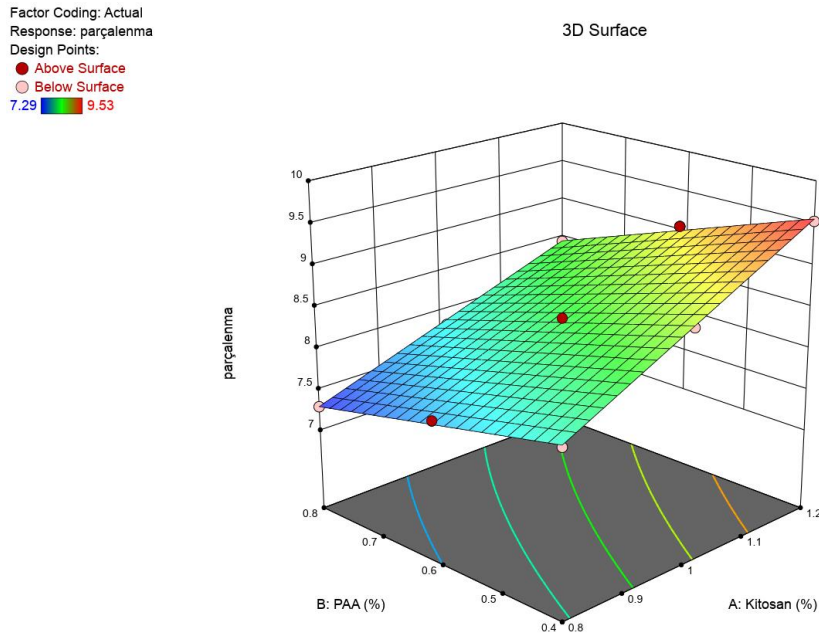


Şekil 4.9. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin birlikte şişme üzerine etkisi

Parçalanma yanıtına ait sonuçlar incelendiğinde şekil 4.10. ve şekil 4.11.'deki grafikler formülasyondaki CS konsantrasyonundaki artış parçalanma özelliğinde artış sağlarken PAA konsantrasyonundaki artışın parçalanma özelliklerinde düşüşe neden olduğu görülmektedir.



Şekil 4.10. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin ayrı ayrı parçalanma üzerine etkisi



Şekil 4.11. PAA ve CS bağımsız değişkenlerinin birlikte parçalanma üzerine etkisi

Her bir analiz sonucu incelendiğinde ve ANOVA sisteminden çıkan sonuca bakıldığında CS ve PAA için en uygun konsantrasyon değerinin sırasıyla %1.2 a/a ve %0.8 a/a olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 3.6).

Tablo 4.11. Optimum CS ve PAA konsantrasyonu için ANOVA sonuçları

Örneklem	CS	PAA	Adezyon Kuvveti	Elastik Modülü	Şişme	Parçalanma	Tercih Edilebilirlik	
	%	%						
1	1.2	0.8	116.76	442.78	64	8.45	0.550	Seçildi
2	1.2	0.6	112.55	397.22	71	9.06	0.539	
3	1	0.4	74.57	150.71	68	8.76	0.538	
4	1	0.8	86.48	220.97	56	7.81	0.528	
5	0.8	0.6	48.14	96.86	50	7.69	0.527	
6	0.8	0.8	55.63	109.2	46	7.29	0.527	
7	1	0.6	80.52	176.42	63	8.38	0.524	
8	0.8	0.4	41.48	91.31	56	7.98	0.524	
9	1.2	0.4	107.78	334.2	78	9.53	0.524	

4.5. Hazırlanan Mukoadezif Film Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu

Fiziksel Görünüm Analizi

Boş ve ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları fiziksel görünüm, renk, doku ve şeffaflık açısından görsel olarak değerlendirilmiştir. Boş ve ACY yüklü film formülasyonları aynı fiziksel görünüme sahip olup hafif sarı renkli, şeffaf ve buğulu cam görüntüsüne sahip olup hafif pürüzlü bir yüzeye sahiptir.



Şekil 4.12. Boş ve ACY yüklü CS/PAA film formülasyon görüntüleri

Film Ağırlık ve Kalınlık Tekdüzelığı Tayini

ACY yüklü CS/PAA filmlerin ağırlık ve kalınlık değişkenliğini değerlendirmek amacıyla 6 farklı örnek üzerinden ağırlık ve kalınlık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. 1x1 cm'lik parçalar halinde kesilerek filmler hassas dijital terazi kullanılarak ağırlıkları ölçülmüştür. Filmlerin farklı konumlarda tutulan bir kompas yardımıyla kalınlıkları ölçülerek ortalama ağırlık ve kalınlık değerleri, standart sapmaları hesaplanmıştır. Çıkan sonuçların standart sapmaları incelendiğinde filmlerde ağırlık ve kalınlık sapması olmadığı tekdüze bir formülasyon hazırlandığı görülmüştür. (Tablo 4.10.).

Tablo 4.12. Film ağırlık ve kalınlık tekdüzelik tayini verileri (n=6)

Numune	1	2	3	4	5	6	X	SS
Ağırlık (mg)	7,75	7,56	7,48	7,84	7,27	7,54	7,57	0,20
Kalınlık (mm)	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	~0,5

Katlanma Dayanıklılığı Tayini

Hazırlanan ACY yüklü CS/PAA film formülasyonlarının katlanma dayanıklılığı tayini için her bir film kırılıncaya kadar aynı yerden tekrar tekrar

katlanmıştır. Katlama işlemi aynı noktadan ve düzlemle 180°'lik açı oluşturacak şekilde gerçekleştirilmiştir. 6 örnek ile çalışılarak sonuç, ortalama ve standart sapma olarak hesaplanmıştır. Çıkan sonuçlar incelendiğinde filmlerin katlanmaya oldukça dayanıklı olduğu ve filmlerin farklı yerlerinden alınan örneklerde katlanma dayanıklılığında sapma olmadığı görülmüştür. (Tablo 4.11).

Tablo 4.13. Film katlanma dayanıklılığı tayini verileri (n=6).

Numune	1	2	3	4	5	6	X	SS
Katlanma Sayısı	37	41	38	39	39	37	38,50	1,52

pH Ölçümü

Hazırlanan boş ve ACY yüklü CS/PAA film formülasyonlarının yüzey pH değeri Sartorius PP-20 pH ölçer kullanılarak tayin edilmiştir. Boş CS/PAA filmin pH değeri 6.02 ± 0.05 , ACY yüklü CS/PAA film formülasyonunun pH'sı 6.01 ± 0.05 olarak ölçülmüştür (n=6, \pm SS). pH sonuçları incelendiğinde Asiklovir'in pH'ya etkisinin olmadığı ve filmin mukoza için uygulanabilir olduğu görülmüştür.

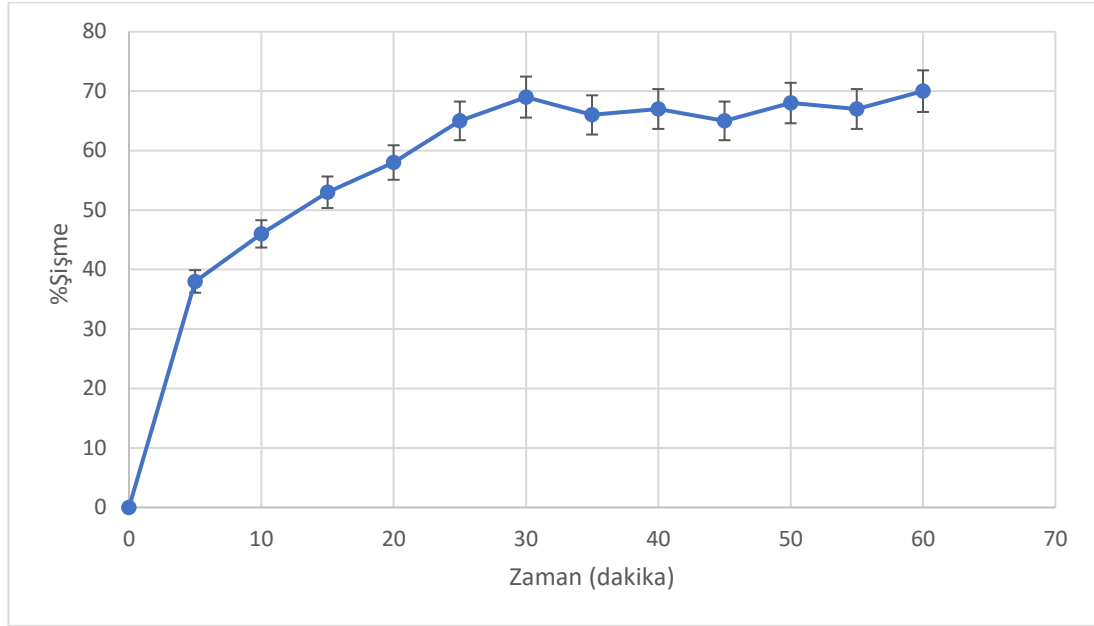
İlaç İçeriği Tekdüzeligi

Asiklovirin film formülasyonlarında ilaç içeriği tekdüzeliği tayini gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan film formülasyonuna bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi yapılarak HPLC'de miktar tayini analizi gerçekleştirilmiştir. Veriler değerlendirilirken önceden hesaplanmış olan % 2'lik kayıp oranı da hesaba katılarak ilaç içeriği tek düzeligi %93.16 olarak bulunmuştur. %10'dan az bir kayıp olduğu görülmüştür, dolayısıyla içerik tekdüzeliği sağlanmıştır.

Şişme Analizi

Filmlerin şişme özellikleri hidrasyon (su alımı) yüzdesi belirlenerek değerlendirilmiştir. Yüzde şişme değeri bölüm 3.2.5'te yer alan eşitlikle hesaplanmış ve grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.6.). Grafik incelendiğinde hazırlanan filmlerin yüksek

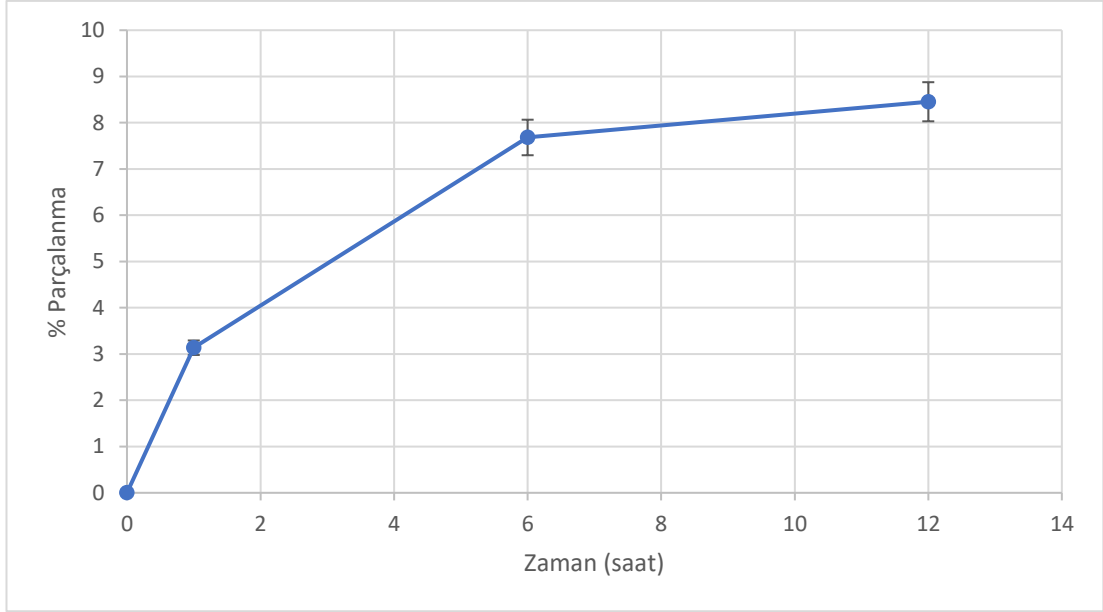
şişme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. 30. dakikadan sonra plato evresine ulaşmış ve yaklaşık %70'lik bir şişme gözlenmiştir.



Şekil 4.13. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonunun zamana karşı % şişme grafiği (n=6).

Parçalanma Analizi

Mukoadhezif film formülasyonlarının parçalanma analizi petri kabı yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yüzde şişme değeri bölüm 3.2.5'te yer alan eşitlikle hesaplanmış ve grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.7.). Grafik incelendiğinde hazırlanan ACY yüklü filmlerin parçalanmaya oldukça dayanıklı olduğu görülmüştür. 12. saatte yapılan ölçümde henüz %10'luk parçalanma meydana gelmediği gözlenmiştir.



Şekil 4.14. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonunun zamana karşı % parçalanma grafiği (n=6).

Adhezyon Kuvvetinin Ölçülmesi

Mukoadhezif polimerlerle hazırlanmış olan film formülasyonunun adhezyon kuvvetinin ölçüsünü belirlemek amacıyla literatürde yer alan doku analizörü cihazı olan Texture Analyser cihazı (TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK) kullanılmıştır. bölüm 3.2.5'te verilen denklemle eğri altı alan kullanılarak adhezyon kuvveti (mJ/cm^2) cinsinden hesaplanmıştır. Adhezyon kuvveti filmin istenen bölgeye uygulanabilirliğini ifade eder. Filmlerin deri ve mukozaya rahat uygulanabilmesi için bu değer yüksek olması istenir. Çıkan analiz sonucuna bakıldığında filmin uygulanabilirliği için oldukça iyi bir adezyon değeri bulunmuştur. Analiz sonucunda adezyon değeri $122,5 \pm 15$ olarak bulunmuştur.

Mekanik özellikler

Hazırlanan film formülasyonlarının mekanik özellikleri, Texture Analyser cihazı (TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK) kullanılarak analiz edilmiştir. Gerilme direnci, elastik modülü ve % uzama ölçülmüştür. Elde edilen veriler tablo 4.14'te sunulmuştur.

Film ağız mukozasına uygulanacağı düşünüldüğünde karşılaşılabilecek fiziksel dış etmenlere karşı dayanıklı olması gerekmektedir. Mekanik özellikler için yapılan analizlere bakıldığında CS/PAA filmin yüksek mekanik dirence sahip olduğu görülmektedir.

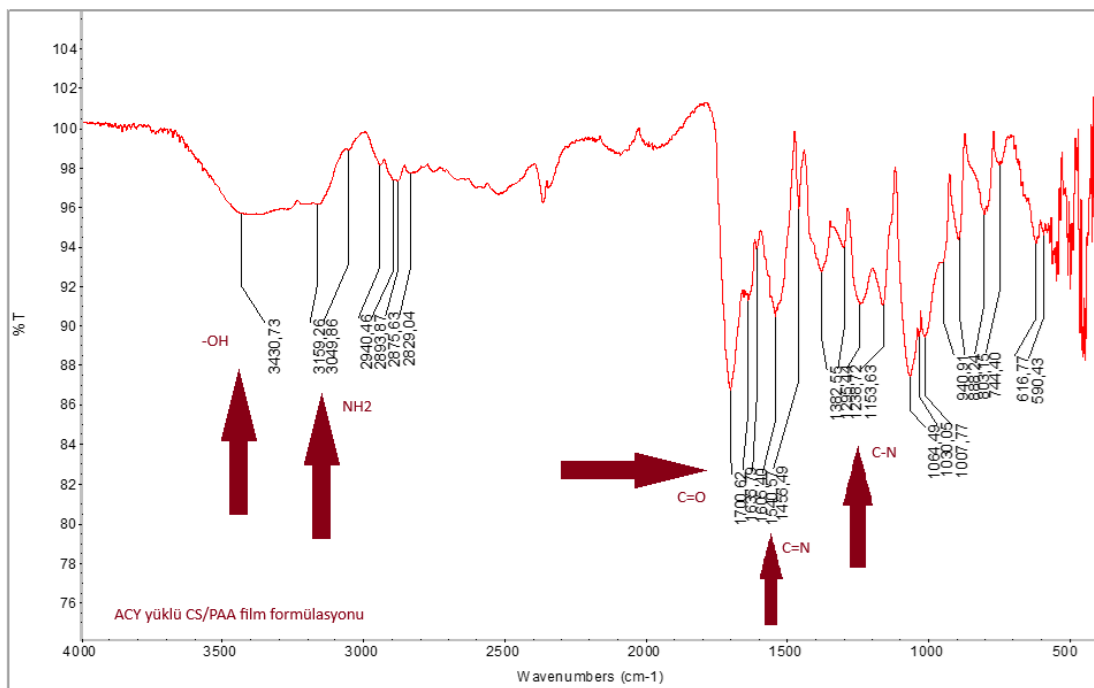
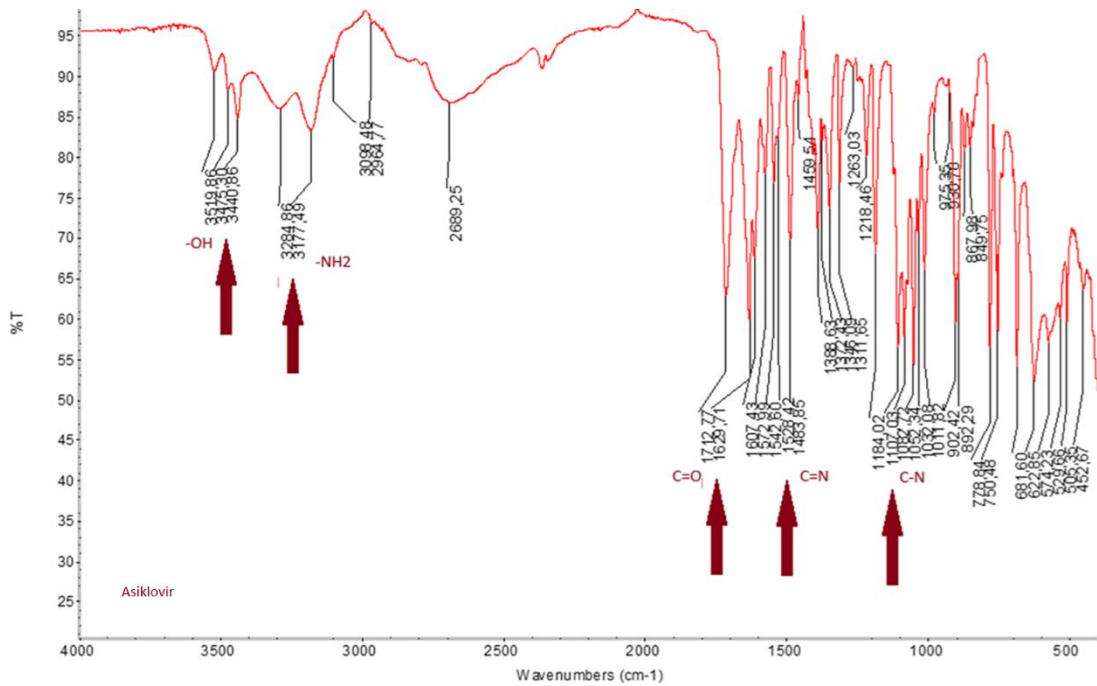
Tablo 4.14. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonuna ait mekanik özellik verileri (n=6)

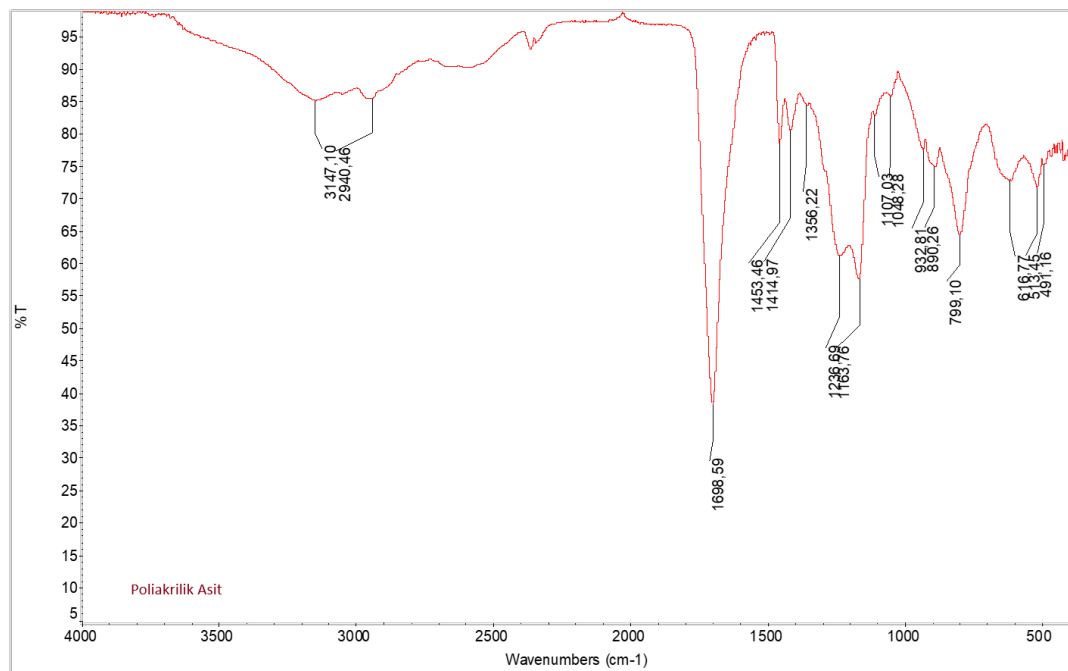
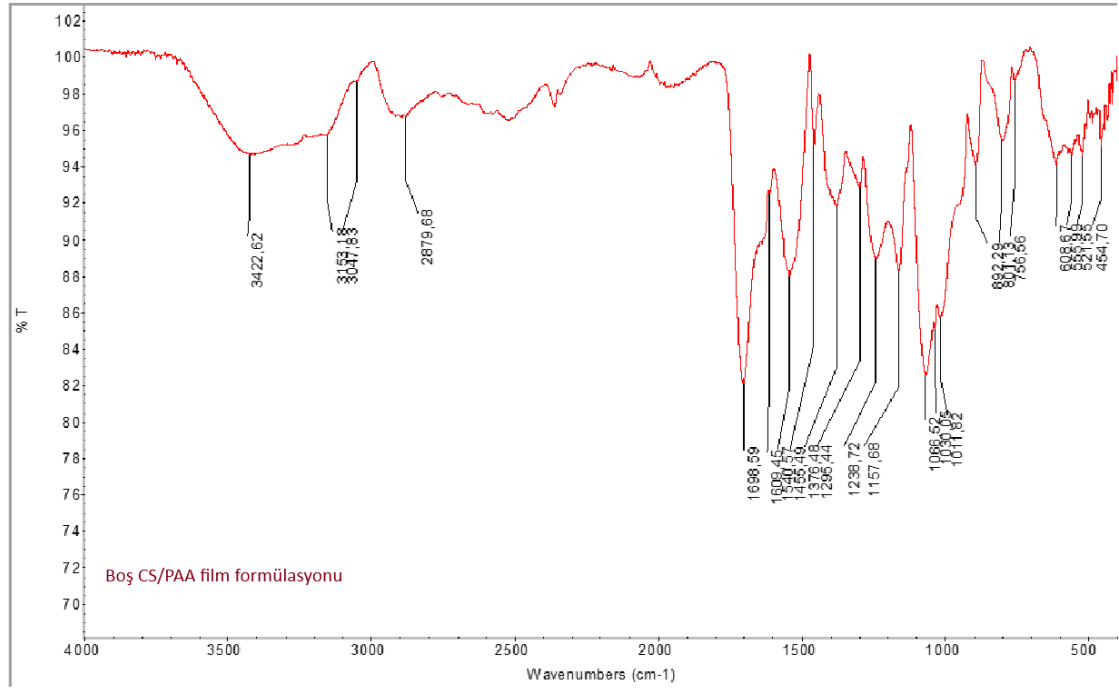
Uzama Miktarı (mm)	% Uzama	Gerilme Direnci (N/mm ²)	Elastik Modülü (N/mm ²)
0,26	0,138	6,0136	470,375

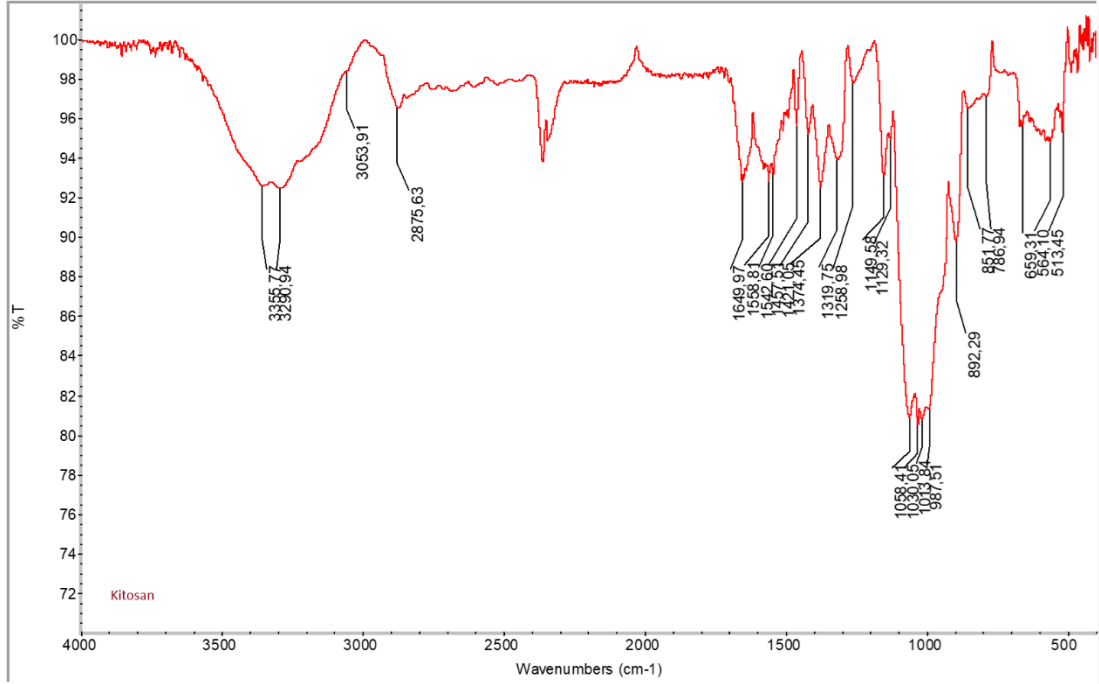
Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Mukoadhezif film formülasyonlarının asiklovir ve formülasyon bileşenlerinin kendi aralarında olan etkileşimini incelemek amacıyla bölüm 3.2.5'te anlatıldığı üzere FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. (Şekil 4.3).

Şekil 4.3.'te Boş CS/PAA film formülasyonu, ACY yüklü CS/PAA film formülasyonu, ACY, PAA, CS'a ait FTIR spektrumları gösterilmektedir. ACY'nin IR spektrumu 3500 cm⁻¹(OH), 1695 cm⁻¹(C=O), 3282 cm⁻¹(NH₂), 1487 cm⁻¹(C=N) ve 1185 cm⁻¹(C-N)'de başlıca emilim pikleri göstermektedir. ACY'nin, CS ve PAA'nın IR spektrumları karşılaştırıldığında formülasyonların IR spektrumlarının ACY'nin tüm karakteristik emilim piklerini gösterdiği ve bunun ACY'nin, formülasyonda yer alan diğer yardımcı maddeler arasında herhangi bir olağandışı etkileşim olmadığına dair kanıt sağladığı bulunmuştur (51).



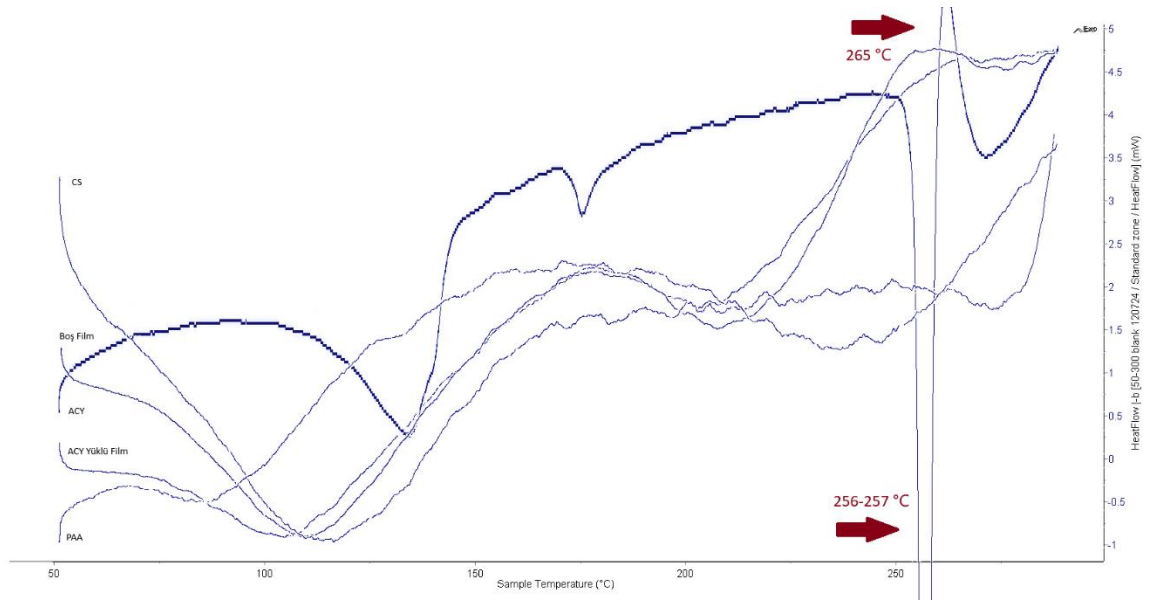




Şekil 4.15. a) Boş CS/PAA film formülasyonu b) ACY yüklü CS/PAA film formülasyonu c) ACY d) PAA e) CS'a ait FTIR spektrumları.

DSC Analizi

Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı şekilde DSC analizi yapılmıştır. ACY, CS, PAA, boş CS/PAA film formülasyonu, ACY yüklü CS/PAA film formülasyon termogramları Şekil 4.4'te gösterilmiştir. DSC termogramları, literatür ile benzer şekilde (48) ACY için 256-257 °C'de bir endotermik pik ve 265 °C'de bir ekzotermik pik olduğunu göstermektedir. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonunda ACY'ye ait endotermik pike rastlanmamış olup, bu durum ACY'nin formülasyonda amorf halde bulunduğunu veya moleküler olarak dağıldığını göstermektedir (Şekil 4.4.).

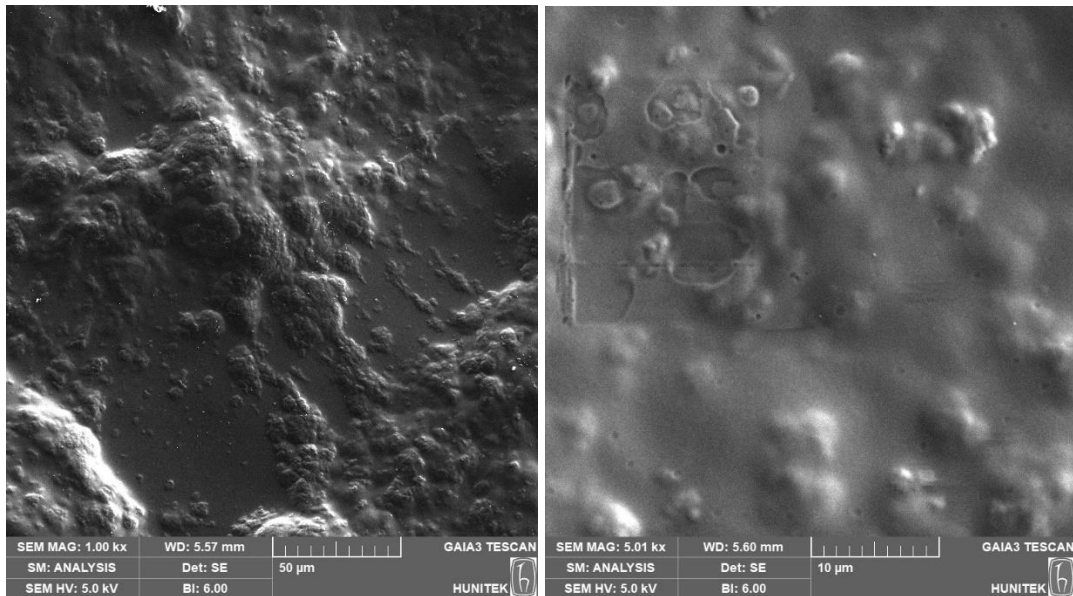


Şekil 4.16. ACY, CS, PAA, Boş CS/PAA film formülasyonu, ACY yüklü CS/PAA film formülasyonuna ait DSC termogramları

Morfolojik Analiz

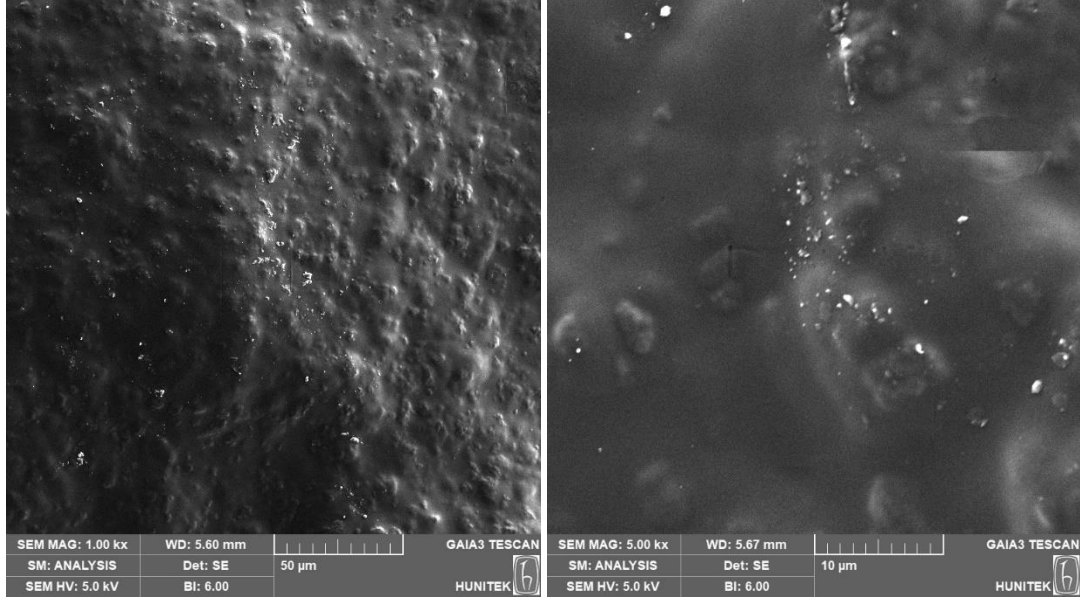
Boş ve ACY yüklü CS/PAA film formülasyonlarına ait SEM görüntüleri Şekil 4.5. ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

a)



Şekil 4.5. a) Boş CS/PAA film formülasyonuna ait SEM görüntüleri (x1000 ve x5000 büyütmede)

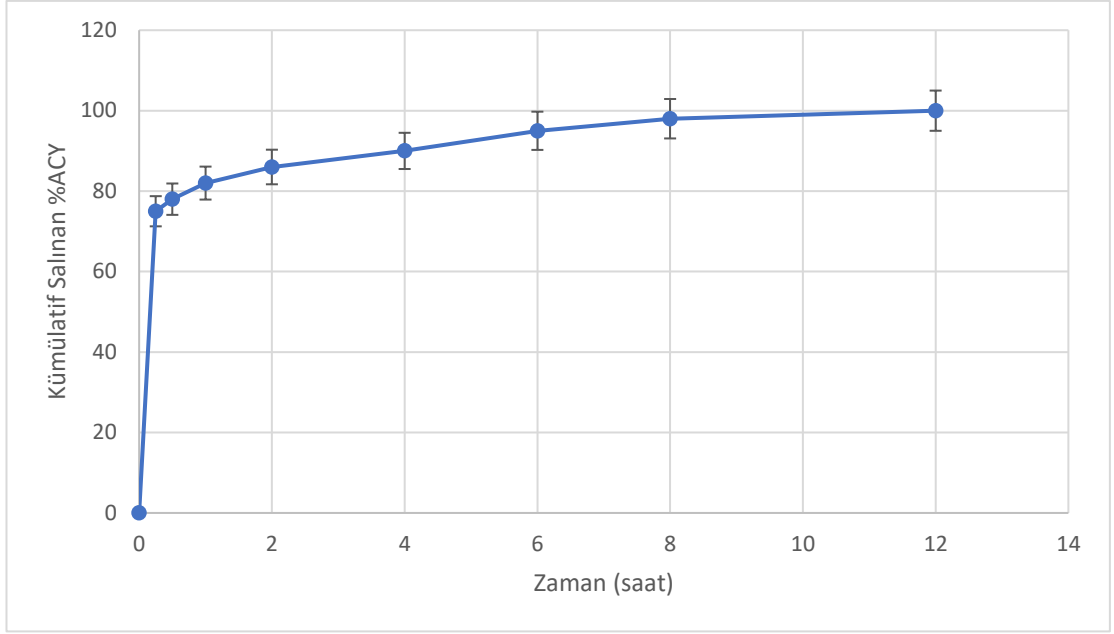
b)



Şekil 4.17. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonuna ait SEM görüntüleri (x1000 ve x5000 büyütmede)

İn Vitro Salım Çalışmaları

ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları ve ACY çözeltisinin in vitro salım çalışmaları pH 6,8 fosfat tamponu çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. (Şekil 4.8.). Elde edilen veriler incelendiğinde ilk 15 dakikada formülasyondan etkin maddenin %75'inin salındığı görülmektedir. Sonrasında ilacın yavaş salındığı ve 12. saatte %100 salındığı görülmektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonu ve serbest ACY çözeltisinden in vitro ACY salım profili (n=3, \pm SS).

5. TARTIŞMA

ACY'nin vitro miktar tayini Bölüm 3.2.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. ACY'nin piki 254 nm'de yapılan seçici dedeksiyon sonucu 5. dakikada saf olarak elde edilmiştir. ACY pikinin 254 nm olarak bulunması literatürle uygundur (52).

Kalibrasyon doğrusunu oluşturmak için 1 ile 100 ppm konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Kullanılan yöntem Bölüm 3.2.2'de açıklanmıştır. Yapılan regresyon analizi sonucunda Şekil 4.2'de görüldüğü üzere HPLC ile elde edilen pik alanları ve konsantrasyonlar arasında doğrusallık gösterilmiştir. Kalibrasyon doğrusunun r^2 değeri 0,9996 olarak bulunmuştur. Kullanılacak analitik yöntemin uygunluğu salım çalışmaları ve içerik tekdüzeliği gibi karakterizasyon çalışmalarında etkin maddenin tayini için önemlidir. Film formülasyonu içindeki etkin madde miktarı ile yapılan hesaplar ile literatür kıyaslandığında çalışılan konsantrasyon aralığının yapılacak olan çalışmalarda miktar tayini için uygun olduğu gösterilmiştir (53).

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğu için yapılan çalışmalar Bölüm 3.2.3.'te açıklanmıştır. Doğruluk çalışması için seçilen 3 konsantrasyon (1, 10, 100 ppm) için de HPLC analizleri gerçekleştirilmiş ve % geri kazanımlar hesaplanmıştır. % geri kazanım sonuçlarına göre ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır. Üç konsantrasyon için de varyasyon katsayısı %2'nin altında bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde analitik yöntemin doğruluğu gösterilmiştir (54).

Kullanılan analitik yöntemin kesinliğinin belirlenebilmesi için tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve günler arası farklılık değerleri hesaplanmıştır (Bölüm 3.2.3). Çalışmalar 10 ppm konsantrasyonda gerçekleştirilmiş ve ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Analizler sonucunda elde edilen verilere bakıldığında varyasyon katsayısının her bir parametre için %2'nin altında olduğu görülmüş ve yöntemin kesinliği gösterilmiştir. Sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında yöntemin duyarlılığının tez çalışması için uygun olduğunu göstermiştir (55).

Analitik yöntemin duyarlılık hesaplamaları Bölüm 3.2.3.'de açıklanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu tanıma sınırı 0,036 µg/mL ve alt tayin sınırı 0,11 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında yöntemin duyarlılığının tez çalışması için uygun olduğunu göstermiştir (56).

Özgünlük çalışmaları kapsamında etkin madde (ACY) ve çalışmada kullanılan CS, PAA ve PBS gibi yardımcı maddelerin kromatogramları elde edilmiştir. Elde edilen pikler incelendiğinde yardımcı maddelerin kromatogramlarındaki pikler ACY ile girişim yapmamıştır. Dolayısıyla ACY için geliştirilen tayin yönteminin ACY için özgün olduğu ispatlanmıştır.

ACY'nin 24 saatlik stabilite çalışması yapılmış ve 10 ppm konsantrasyonunda hazırlanan çözeltinin 24 saat sonunda %99'u ortamda tayin edilmiştir. Ek olarak herhangi bir bozunma ürününe ait bir pike rastlanmamıştır. Analiz sonucu etken maddenin ortam koşullarında stabil olduğunu göstermiştir.

ACY yüklü CS/PAA film formülasyonlarının hazırlanmasında çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Çözücü buharlaştırma yöntemi oldukça pratik ve ucuz bir yöntemdir. Film oluşturma için en çok tercih edilen yöntemdir. Kullanılan etken madde ve yardımcı maddeler için de uygun olması nedeniyle formülasyon geliştirmek için bu yöntem tercih edilmiştir (57).

Film formülasyonun hazırlanmasında CS ve PAA kullanılmıştır. CS, biyoyumluluk, düşük toksisite ve biyobozunur özellikleri sayesinde birçok ilaç formülasyonu için tercih edilmektedir. Kitosanın bu üstünlüklerine ek olarak film oluşturucu özelliği sayesinde, sürekli ilaç salımı için de tercih edilmektedir. Kitosan, mukoadesif ve katyonik özellikleri nedeniyle anyonik polimerler ile etkileşimleri de incelenerek mukoadesif film formülasyonları için kullanılabilmesi öngörülmüştür. Ayrıca kitosanın penetrasyon özellikleri de incelenmiş ve bu penetrasyon özelliği sayesinde mukoadesif filmler için tercih nedeni olmuştur (58).

Anyonik bir polimer olan Poliakrilik asit de kitosan gibi membran penetrasyonunu artırıcı özelliği bilinmektedir. Membran penetrasyonunu artırıcı özelliğini hücre dışı Ca^{2+} 'yı şelatlama yeteneğinden sağladığı bulunmuştur. Bu

özellikleri sayesinde birçok film formülasyonunda kullanılmak üzere araştırılmıştır. Bu nedenle CS'a ek olarak formülasyona PAA eklenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür (59).

ACY ve CS için uygun bir çözücü olması nedeniyle asetik asit çözücü olarak tercih edilmiştir. Yüksek konsantrasyonda kullanılmadıkça toksik olmaması ve kolay ulaşılabilir olması da tercih edilme nedeni olmuştur (60, 61).

Formülasyon geliştirme çalışmaları için literatürde belirtilen CS/PAA konsantrasyon aralıkları incelenerek öncelikle geniş bir konsantrasyon aralığında çalışıldıktan sonra aralık düşürülerek ANOVA sisteminde faktöriyel tasarım kullanılarak optimum CS ve PAA konsantrasyonu bulunmuştur. Faktöriyel tasarım yöntemi hem yenilikçi hem de vakit ve madde tasarrufu sağlaması nedeniyle oldukça tercih edilebilir bir yöntemdir (62).

Boş ve ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları fiziksel görünüm, renk, doku ve şeffaflık açısından görsel olarak değerlendirilmiştir. ACY'nin çözelti içerisinde tamamen çözünmesi nedeniyle boş ve yüklü filmlerde görünüm açısından farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Formülasyonlar hafif sarı renkli, şeffaf ve buğulu cam görüntüsüne sahip olup hafif pürüzlü bir yüzeye sahiptir.

ACY yüklü CS/PAA film formülasyonlarının ağırlık ve kalınlığı değişkenliği Bölüm 3.2.5.'te anlatıldığı üzere yapılmıştır. Elde edilen verilerin standart sapmaları incelendiğinde filmlerde ağırlık ve kalınlık sapması olmadığı tekdüze bir formülasyon hazırlandığı görülmüştür. Film formülasyonunun ağırlık ve kalınlık tekdüzeliğine sahip olması hazırlanan tüm filmlerin birbirine eşdeğer olduğunu göstermektedir (63).

Filmler kullanım yolları ve yapıları nedeniyle katlanmaya karşı dayanıklı ve esnek yapıya sahip olmalıdır. Hazırladığımız filmlerde yapılan katlanma dayanıklılığı tayininde gördüğümüz üzere hazırlanan filmlerin her bir bölümü aynı katlanma dayanıklılığına sahip olmakla birlikte oldukça esnek ve kırılmaya karşı da dayanıklıdır (64).

Mukoadezif filmler mukozaya uygulanması nedeniyle tahrişe neden olmamak adına uygun bir pH'a sahip olması gerekmektedir. Bu nedenle yapmış olduğumuz pH analizlerinde pH 6.01 ± 0.05 olarak bulunmuştur (65).

Hazırlanan filmlerde ilaç içeriğinin tekdüze olması her bir filmde eşit oranda ilaç olmasını ve dolayısıyla ilaç dozlamasının sağlanmasında önemli bir faktördür. Bu nedenle filmlerde ilaç içeriği tekdüzeliği testleri yapılmıştır. Kayıp madde hesabı da katılarak yapılan analizlerde yaklaşık %93 oranında ilaç içerik tekdüzeliğine ulaşılmıştır. Literatür uygunluğu değerlendirildiğinde ilaç kaybının %10'dan küçük olarak bulunması nedeniyle hazırlanan film formülasyonunun içerik tekdüzeliği açısından uygun olduğu söylenebilmektedir (66).

Mukoadezif film formülasyonlarının uygulama şekli nedeniyle ortam sıvısında şişebilmesi ve bu sayede ilacın ortamda çözünmesini sağlayabilmesi gerekmektedir. Hazırlanan filmlerde yapılan şişme analizlerinde ilk 5 dakikada yaklaşık %35 lik oldukça yüksek bir şişme seviyesi görülürken uzun süreli analizde %70'e kadar bu şişme seviyesi çıkabilmiştir. Literatürde filmler üzerinde yapılan araştırmalara bakıldığında hazırlanmış olduğumuz filmin % şişme değerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir (67).

Yapılan şişme analizlerde filmlerin yüksek şişme değerlerine sahip olduğu görüşmüştür. Bu şişme değerlerinin uzun ilaç salımının incelenmesi için ayrıca sağlayabilmesi için ortam sıvısında parçalanmaması istenmektedir. Bu nedenle vücudun sıcaklığında ve 6.8 pH PBS ortamında parçalanma analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda 12. Saatin sonunda yaklaşık %8.5'lik parçalanma gerçekleşmiştir. İlacın 12. Saatin sonunda %100 salındığını düşünürsek ilaç salımı bitene kadar filmlerde kayda değer bir parçalanma olmadığı görülmüş olur. Bu da filmlerin parçalanmaya karşı oldukça dayanıklı olduğunu göstermektedir (66).

Mukoadezif filmler uygulandığı bölgeye tutunabilmeleri için adezyon kuvvetlerinin de yeterli seviyede olması gerekmektedir. Hazırlanmış olduğumuz filmlerin adezyon kuvvetlerini ölçmek için yapılan analizlerde adezyon değeri mukoadezyon değeri $122,5 \pm 15 \text{ mJ/cm}^2$ olarak belirlenmiştir. Bu değer film formülasyonunun mukoza tutunup ilaç salabilmesi için oldukça yeterli bir kuvvettir.

Mukoadezif filmlerin uygulama bölgesinde uzun süre kalabilmesi için adezyon kuvvetinin yanı sıra mekanik özelliklerinin de yeterli olması gerekmektedir. Filmlerin mekaniz özelliklerini değerlendirme adına Texture Analyser cihazında % uzama, gerilme direnci ve elastik modülü parametreleri incelenmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında, filmin uzamaya karşı oldukça dirençli olduğu (%0.138), gerilme direnci ve elastik modülü değerlerinin de yeterli derecede yüksek olduğu görülmüştür (68, 69).

Film formülasyonunda kullanılacak maddeler birbirleriyle uyumlu olması ilaç salımı ve ilacın terapötik etkisinin devam ettiğinden emin olması adına oldukça önemlidir. Bu uyumun analiz edilebilmesi için ACY ve formülasyon bileşenlerinin (CS, PAA) kendi aralarında olan etkileşimini incelemek için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler için ACY, CS, PAA ile ACY yüklü CS/PAA film formülasyonları ve boş CS/PAA film formülasyonları üzerinde çalışılmıştır. Elde edilen FTIR spektrumları incelendiğinde FTIR spektrumlarının ACY'nin tüm karakteristik emilim piklerini gösterdiği ve bunun ACY'nin, formülasyonda yer alan diğer yardımcı maddeler arasında herhangi bir olağandışı etkileşim olmadığına dair kanıt sağladığı bulunmuştur (70, 71).

Film formülasyon bileşenlerinin ve film formülasyonlarının termal özelliklerinin belirlenmesi ve etkin maddelerin ile etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda DSC termogramları incelendiğinde literatürde açıklandığı gibi ACY için 256-257 °C'de endotermik tepe ve 265 °C'de ekzotermik tepe olduğu görülmüştür. İlki erime sıcaklığı ve ikincisi ise ayrışma noktası olduğu düşünülmüştür. ACY yüklü CS/PAA film formülasyonu erime tepesi göstermedi, bu da formülasyonda amorf olarak bulunduğunu veya moleküler olarak dağıldığını düşündürmektedir (72, 73).

6. SONUÇ

ACY'in düşük biyoyararlanımı, düşük permeabilitesi ve kısa yarılanma ömrü nedeniyle topikal uygulamadaki terapötik etkinliği arttırmak amacıyla ve HSV'nin tedavisinde kullanmak amacıyla ACY yüklü CYS/PAA içeren film formülasyonları hazırlanmıştır.

Çözücü buharlaştırma yöntemi ile suda çözünürlüğü çok düşük olan bir etken madde olan ACY'nin CS/PAA içeren film formülasyonları hazırlanmıştır.

Hazırlanan film formülasyonlarında ACY miktar tayini yönteminin uygulanabilirliğini değerlendirmek adına kalibrasyon çalışmaları yapılmış ve literatürle karşılaştırılıp geliştirilen yöntemin uygunluğu kanıtlanmıştır.

Elde edilen film formülasyonlarının in vitro karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonucunda hazırlanan filmlerin uygun fiziksel görünümüne, ağırlık ve kalınlık tekdüzeliğine, içerik tekdüzeliğine ve yüksek katlanma dayanıklılığına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan pH nötralizasyon çalışmaları da filmlerin deriye uygulanabilir olduğunu da kanıtlanmıştır.

Hazırlanan film formülasyonlarında şişme, parçalanma ve salım çalışmaları yapılmış ve elde edilen değerler incelendiğinde filmlerin yeterli derecede şiştiği gözlenmiştir. Ayrıca ilaç salınımının % 100'e ulaşana kadar kümülatif yüzde parçalanma değerinin %10'un altında kaldığı görülmüştür. Literatürle değerler karşılaştırılmış ve filmlerin uygun parçalanma ve şişme değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

Filmlerde salım çalışmalarında, filmlerin 15. Dakikada %75 oranında ilacı saldığı görülmüştür. Bu durum etken maddenin istenen bölgeye hızlı nüfuz etmesini sağlamaktadır. Daha sonrasında ise 12. Saate kadar yavaş yavaş ilaç salımı yapılması da kontrollü ilaç salımını kanıtlamaktadır.

Adezyon ve mekanik özellik değerlendirilmeleri de yapılmış ve sonuçlar literatürle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde hazırlanan filmlerin uygulanacak bölgeye yeterli adezyonu sağladığı ve uygulandığı bölgede karşılaşılabilecek mekanik dış etkenlere karşı dirençli olacağı gösterilmiştir.

Etken maddenin formülasyonda yer alan diğey yardımcı maddeler ile geçimliliğini değerlendirebilmek adına DSC ve FTIR analizleri geręekleřtirilmiřtir. Literatür ile karşılaştırmalar yapılmış ve yapılan karşılaştırmalar sonucunda ACY'in terapötik etkisini kaybetmediği ayrıca formülasyon içerisinde dağıldığı gösterilmiştir.

Dünya şapında oldukça yaygın olan HSV'nin topikal tedavisi hali hazırda kullanılmakta olan ve düşük biyoyararlanıma sahip olan ACY'in lokal olarak uygulanabilmesi için deriden geçirgenliği arttırdığı bilinen CS/PAA içeren filmlerin hazırlanması hedeflenmiştir. Yapılan karakterizasyon şalışmaları ve literatür incelemeleri sonrasında hazırlamış olduğumuz film formülasyonunun umut vaat eden sistemler olduğu sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc)*. 2014;79(13):1635-52.
2. Brady RC, Bernstein DI. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res*. 2004;61(2):73-81.
3. Chang JY, Balch C, Puccio J, Oh HS. A Narrative Review of Alternative Symptomatic Treatments for Herpes Simplex Virus. *Viruses*. 2023;15(6).
4. Klysik K, Pietraszek A, Karewicz A, Nowakowska M. Acyclovir in the Treatment of Herpes Viruses - A Review. *Curr Med Chem*. 2020;27(24):4118-37.
5. Choi E, Nahm FS, Han WK, Lee PB, Jo J. Topical agents: a thoughtful choice for multimodal analgesia. *Korean J Anesthesiol*. 2020;73(5):384-93.
6. Brizuela M, Winters R. Histology, Oral Mucosa. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2024.
7. Aranaz I, Alcantara AR, Civera MC, Arias C, Elorza B, Heras Caballero A, et al. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers (Basel)*. 2021;13(19).
8. Saint-Aubin K, Poulin P, Saadaoui H, Maugey M, Zakri C. Dispersion and film-forming properties of poly(acrylic acid)-stabilized carbon nanotubes. *Langmuir*. 2009;25(22):13206-11.
9. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage*. 2006;52(9):24-35; quiz 6-7.
10. Braverman IM. The cutaneous microcirculation. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000;5(1):3-9.
11. Blair MJ, Jones JD, Woessner AE, Quinn KP. Skin Structure-Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2020;9(3):127-43.
12. Rittie L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1):a015370.
13. Marcos-Garces V, Molina Aguilar P, Bea Serrano C, Garcia Bustos V, Benavent Segui J, Ferrandez Izquierdo A, et al. Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study. *J Anat*. 2014;225(1):98-108.
14. Arda O, Goksugur N, Tuzun Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol*. 2014;32(1):3-13.
15. Society for Investigative Dermatology., European Society for Dermatological Research. *Journal of investigative dermatology symposium proceedings*. Cambridge, MA.
16. Feingold KR, Elias PM. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(3):280-94.
17. Lai PM, Roberts MS. An analysis of solute structure-human epidermal transport relationships in epidermal iontophoresis using the ionic mobility: pore model. *J Control Release*. 1999;58(3):323-33.
18. Fung KYY, Fairn GD, Lee WL. Transcellular vesicular transport in epithelial and endothelial cells: Challenges and opportunities. *Traffic*. 2018;19(1):5-18.
19. Melkikh AV, Sutormina M. Intra- and intercellular transport of substances: Models and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2020;150:184-202.
20. Souto EB, Fangueiro JF, Fernandes AR, Cano A, Sanchez-Lopez E, Garcia ML, et al. Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. *Heliyon*. 2022;8(2):e08938.
21. Moser K, Kriwet K, Froehlich C, Kalia YN, Guy RH. Supersaturation: enhancement of skin penetration and permeation of a lipophilic drug. *Pharm Res*. 2001;18(7):1006-11.

22. Aboelwafa AA, El-Setouhy DA, Elmeshad AN. Comparative study on the effects of some polyoxyethylene alkyl ether and sorbitan fatty acid ester surfactants on the performance of transdermal carvedilol proniosomal gel using experimental design. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(4):1591-602.
23. Piccinin MA, Zito PM. *Anatomy, Head and Neck, Lips*. StatPearls. Treasure Island (FL)2024.
24. Silva BM, Borges AF, Silva C, Coelho JF, Simoes S. Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs. *Int J Pharm*. 2015;494(1):537-51.
25. Leal J, Smyth HDC, Ghosh D. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int J Pharm*. 2017;532(1):555-72.
26. Kurn H, Daly DT. *Histology, Epithelial Cell*. StatPearls. Treasure Island (FL)2024.
27. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57(5):737-63; quiz 64-6.
28. Oakley C, Epstein JB, Sherlock CH. Reactivation of oral herpes simplex virus: implications for clinical management of herpes simplex virus recurrence during radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;84(3):272-8.
29. Ohana B, Lipson M, Vered N, Srugo I, Ahdut M, Morag A. Novel approach for specific detection of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies and immunoglobulin G and M antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(6):904-8.
30. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140765.
31. Petti S, Lodi G. The controversial natural history of oral herpes simplex virus type 1 infection. *Oral Dis*. 2019;25(8):1850-65.
32. Berkhout A, Yeoh DK, Teutsch S, Morris A, Nourse C, Clark JE, et al. Herpes simplex virus in infancy: Evaluation of national surveillance case capture. *J Paediatr Child Health*. 2024.
33. Wald A. Herpes simplex virus type 2 transmission: risk factors and virus shedding. *Herpes*. 2004;11 Suppl 3:130A-7A.
34. Whitley RJ, Alford CA, Hirsch MS, Schooley RT, Luby JP, Aoki FY, et al. Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med*. 1986;314(3):144-9.
35. Poole CL, Kimberlin DW. Antiviral Approaches for the Treatment of Herpes Simplex Virus Infections in Newborn Infants. *Annu Rev Virol*. 2018;5(1):407-25.
36. Stephenson MB, Glaenger B, Malamis A. Percutaneous Minimally Invasive Techniques in the Treatment of Spinal Metastases. *Curr Treat Options Oncol*. 2016;17(11):56.
37. Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *J Control Release*. 2016;240:77-92.
38. Leppert W, Malec-Milewska M, Zajackowska R, Wordliczek J. Transdermal and Topical Drug Administration in the Treatment of Pain. *Molecules*. 2018;23(3).
39. Laffleur F, Roggla J, Idrees MA, Griessinger J. Chemical modification of hyaluronic acid for intraoral application. *J Pharm Sci*. 2014;103(8):2414-23.
40. Al-Dhubiab BE, Nair AB, Kumria R, Attimarad M, Harsha S. Development and evaluation of buccal films impregnated with selegiline-loaded nanospheres. *Drug Deliv*. 2016;23(7):2154-62.
41. Borges AF, Silva C, Coelho JF, Simoes S. Oral films: Current status and future perspectives: I - Galenical development and quality attributes. *J Control Release*. 2015;206:1-19.

42. Rençber S, Karavana SY, Senyigit ZA, Erac B, Limoncu MH, Baloglu E. Mucoadhesive in situ gel formulation for vaginal delivery of clotrimazole: formulation, preparation, and in vitro/in vivo evaluation. *Pharm Dev Technol.* 2017;22(4):551-61.
43. Kathe K, Kathpalia H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J Pharm Sci.* 2017;12(6):487-97.
44. Huang KX, Zhou LY, Chen JQ, Peng N, Chen HX, Gu HZ, et al. Applications and perspectives of quaternized cellulose, chitin and chitosan: A review. *Int J Biol Macromol.* 2023;242(Pt 3):124990.
45. Shimoda H, Taniguchi K, Nishimura M, Matsuura K, Tsukioka T, Yamashita H, et al. Preparation of a fast dissolving oral thin film containing dexamethasone: a possible application to antiemesis during cancer chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;73(3):361-5.
46. Patil H, Tiwari RV, Repka MA. Hot-Melt Extrusion: from Theory to Application in Pharmaceutical Formulation. *AAPS PharmSciTech.* 2016;17(1):20-42.
47. Biedrzycka K, Marcinkowska A. The Use of Hot Melt Extrusion to Prepare a Solid Dispersion of Ibuprofen in a Polymer Matrix. *Polymers (Basel).* 2023;15(13).
48. Bala R, Pawar P, Khanna S, Arora S. Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system. *Int J Pharm Investig.* 2013;3(2):67-76.
49. Germini G, Peltonen L. 3D Printing of Drug Nanocrystals for Film Formulations. *Molecules.* 2021;26(13).
50. Wei YP, Yao LY, Wu YY, Liu X, Peng LH, Tian YL, et al. Critical Review of Synthesis, Toxicology and Detection of Acyclovir. *Molecules.* 2021;26(21).
51. Lutker KM, Quinones R, Xu J, Ramamoorthy A, Matzger AJ. Polymorphs and hydrates of acyclovir. *J Pharm Sci.* 2011;100(3):949-63.
52. Hassan H, Adam SK, Alias E, Meor Mohd Affandi MMR, Shamsuddin AF, Basir R. Central Composite Design for Formulation and Optimization of Solid Lipid Nanoparticles to Enhance Oral Bioavailability of Acyclovir. *Molecules.* 2021;26(18).
53. Kulkarni M, Potdar S, Date AA, Marfatiya A. In Vitro Release Testing of Acyclovir Topical Formulations Using Immersion Cells. *Assay Drug Dev Technol.* 2021;19(2):75-84.
54. Zendelovska D, Simeska S, Atanasovska E, Georgievska K, Kikerkov I, Labachevski N, et al. Determination of Acyclovir in Human Plasma Samples by HPLC Method with UV Detection: Application to Single-Dose Pharmacokinetic Study. *Open Access Maced J Med Sci.* 2015;3(1):32-6.
55. Mulabagal V, Annaji M, Kurapati S, Dash RP, Srinivas NR, Tiwari AK, et al. Stability-indicating HPLC method for acyclovir and lidocaine in topical formulations. *Biomed Chromatogr.* 2020;34(3):e4751.
56. Sharma M, Nautiyal P, Jain S, Jain D. Simple and rapid RP-HPLC method for simultaneous determination of acyclovir and zidovudine in human plasma. *J AOAC Int.* 2010;93(5):1462-7.
57. Ruslan MFH, Janakiraman AK, Ming LC, Uddin AH, Sarker ZI, Bin LK. Comparison of Solvent Casting and Spray Casting Method on Compounding of an Orally Disintegrating Film Containing Amlodipine Besylate. *Int J Pharm Compd.* 2022;26(2):155-62.
58. Amor IB, Emran TB, Hemmami H, Zeghoud S, Laouini SE. Nanomaterials based on chitosan for skin regeneration: an update. *Int J Surg.* 2023;109(3):594-6.
59. Zhou C, Chen L, Zhou W, Wang L, Zhang R, Yang C. Antimicrobial polyacrylic acid/tannic acid hydrogel wound dressing facilitating full-thickness skin healing. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2024;35(4):501-18.
60. Chen Q, Zhou K. Acetic Acid Use in Chronic Wound Healing: A Multiple Case Series. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2022;49(3):286-9.

61. Furuike T, Komoto D, Hashimoto H, Tamura H. Preparation of chitosan hydrogel and its solubility in organic acids. *Int J Biol Macromol*. 2017;104(Pt B):1620-5.
62. McHugh ML. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011;21(3):203-9.
63. Kittipongpatana OS, Trisopon K, Wattanaarsakit P, Kittipongpatana N. Fabrication and Characterization of Orodispersible Composite Film from Hydroxypropylmethyl Cellulose-Crosslinked Carboxymethyl Rice Starch. *Membranes (Basel)*. 2022;12(6).
64. Salehi S, Boddohi S. New formulation and approach for mucoadhesive buccal film of rizatriptan benzoate. *Prog Biomater*. 2017;6(4):175-87.
65. Proksch E. pH in nature, humans and skin. *J Dermatol*. 2018;45(9):1044-52.
66. Inoue Y, Mitsumori A, Shinohara I, Narumi S, Murata I, Kanamoto I. Evaluation between the Usability and Physicochemical Property of Acyclovir Ointments. *J Pharm (Cairo)*. 2018;2018:8761394.
67. Jacob S, Nair AB, Boddu SHS, Gorain B, Sreeharsha N, Shah J. An Updated Overview of the Emerging Role of Patch and Film-Based Buccal Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2021;13(8).
68. Davidovich-Pinhas M, Bianco-Peled H. Mucoadhesion: a review of characterization techniques. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(2):259-71.
69. Hoffmann A, Daniels R. A novel test system for the evaluation of oral mucoadhesion of fast disintegrating tablets. *Int J Pharm*. 2018;551(1-2):141-7.
70. Sawdon AJ, Peng CA. Polymeric micelles for acyclovir drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;122:738-45.
71. Mills A, McDonnell L, Yusufu D. Colorimetric CO(2) Indicators. *Acc Mater Res*. 2023;4(7):570-9.
72. Tsiptsias C, Fardis D, Ntampou X, Tsivintzelis I, Panayiotou C. Thermal Behavior of Poly(vinyl alcohol) in the Form of Physically Crosslinked Film. *Polymers (Basel)*. 2023;15(8).
73. Deshkar S, Sikchi S, Thakre A, Kale R. Poloxamer Modified Chitosan Nanoparticles for Vaginal Delivery of Acyclovir. *Pharm Nanotechnol*. 2021;9(2):141-56.

8. EKLER

EK-1. Turnitin Ekran Görüntüsü

HERPES SİMPEKS ENFEKSİYONUNUN TOPIKAL YOLLA TEDAVİSİNE YÖNELİK ASİKLOVİR YÜKLÜ KİTOSAN-POLİAKRİLİK ASİT FİLM FORMÜLASYONLARI HAZIRLANMASI VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ.pdf

ORJİNALLİK RAPORU

% 17	% 16	% 5	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 9
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	repositori.uin-alaudidin.ac.id İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.vuvu.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1

EK-2. Dijital Makbuz

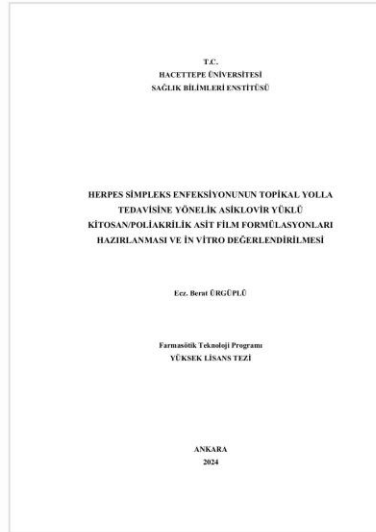


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Berat Ürgüplü
Ödev başlığı: HERPES SİMPEKS ENFEKSİYONUNUN TOPİKAL YOLLA TEDAV...
Gönderi Başlığı: HERPES SİMPEKS ENFEKSİYONUNUN TOPİKAL YOLLA TEDAV...
Dosya adı: HERPES_SİMPEKS_ENFEKSİYONUNUN_TOPİKAL_YOLLA_TED...
Dosya boyutu: 2.43M
Sayfa sayısı: 89
Kelime sayısı: 14,896
Karakter sayısı: 99,255
Gönderim Tarihi: 13-Eyl-2024 10:19ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2452804797



9. ÖZGEÇMİŞ
BERAT ÜRGÜPLÜ